(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号

特表2008-545412

(P2008-545412A)

(43)公表日　平成20年12月18日(2008.12.18)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 5/06	(2006.01)	C12N	5/00	ZNAE	4B024
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B063
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	B	4B065
C12Q 1/02	(2006.01)	C12Q	1/02		4C081
A61K 35/28	(2006.01)	A61K	35/28		4C087

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 42 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2008-513668 (P2008-513668)
(86)(22)出願日　平成18年5月23日 (2006.5.23)
(85)翻訳文提出日　平成20年1月16日 (2008.1.16)
(86)国際出願番号　PCT/US2006/020078
(87)国際公開番号　WO2006/127809
(87)国際公開日　平成18年11月30日 (2006.11.30)
(31)優先権主張番号　60/684,147
(32)優先日　平成17年5月24日 (2005.5.24)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/753,212
(32)優先日　平成17年12月22日 (2005.12.22)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　505291480
ホワイトヘッド　インスティチュート　フォー　バイオメディカル　リサーチ
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１４２　ケンブリッジ，ナイン　ケンブリッジ　センター
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100096183
弁理士　石井　貞次
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節
(74)代理人　100111741
弁理士　田中　夏夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】培養した造血幹細胞を拡大しかつ分析する方法

(57)【要約】
造血幹細胞を増殖するための方法とキットが提供される。前記方法は、細胞を１以上のアンギオポエチン様タンパク質を含む培地中で、HSCを拡大するのに十分な条件下で培養するステップを含んでなる。アンギオポエチン様タンパク質には、アンギオポエチン様タンパク質2、アンギオポエチン様タンパク質3、アンギオポエチン様タンパク質4、アンギオポエチン様タンパク質5、アンギオポエチン様タンパク質7、およびミクロフィブリル関連糖タンパク質（Mfap4）が含まれる。造血幹細胞を同定する方法が提供されかつ単離された造血幹細胞も提供される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
造血幹細胞をin vitroで増殖する方法であって、１以上の細胞をアンギオポエチン様タンパク質を含む培地中で培養するステップを含んでなり、その場合、少なくとも1つの細胞が１以上の血液細胞型に分化できることを特徴とする前記方法
【請求項２】
アンギオポエチン様タンパク質がアンギオポエチン様タンパク質2およびアンギオポエチン様タンパク質3からなる群より選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
アンギオポエチン様タンパク質がアンギオポエチン様タンパク質4、およびアンギオポエチン様タンパク質5からなる群より選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
アンギオポエチン様タンパク質が約0.1ng/mL～約500ng/mLの濃度で存在する、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
アンギオポエチン様タンパク質が遺伝子組換えにより産生される、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
アンギオポエチン様タンパク質がグリコシル化されている、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
細胞を少なくとも5日間培養する、請求項１に記載の方法。
【請求項８】
細胞を少なくとも10日間培養する、請求項１に記載の方法。
【請求項９】
培地が無血清培地である、請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
培地がさらにインスリン成長因子（IGF）、繊維芽細胞成長因子（FGF）、トロンボポエチン（TPO）、および幹細胞因子（SCF）からなる群より選択される少なくとも１つのさらなる因子を含む、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
さらなる成長因子が約0.1ng/mL～約500ng/mLの濃度で存在する、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
細胞の集団が骨髄球、臍帯血細胞、および 胎児肝細胞からなる群より選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項１３】
１以上の細胞がヒト細胞である、請求項１に記載の方法。
【請求項１４】
１以上の細胞がマウス細胞である、請求項１に記載の方法。
【請求項１５】
１以上の細胞が一次細胞である、請求項１に記載の方法。
【請求項１６】
さらに、１以上の細胞を培養する前にアンギオポエチン様タンパク質と結合する細胞を選択するステップを含んでなる、請求項１に記載の方法。
【請求項１７】
さらに、１以上の細胞を培養した後に、Sca-1^{+}、CD45^{+}、IGF2-hFC^{+}、CD31^{+}、およびKit^{+}からなる群より選択される少なくとも１つのポジティブな細胞表面マーカーを発現する、および／または、PrP、Lin、およびCD62Lからなる群より選択される少なくとも１つのネガティブな細胞表面マーカーを発現しない細胞を選択するステップを含んでなる、請求項１に記載の方法。

【請求項１８】
請求項１に記載の方法により産生した造血幹細胞。
【請求項１９】
造血幹細胞を増殖する方法であって、１以上の一次細胞を少なくとも５日間、アンギオポエチン様タンパク質2、アンギオポエチン様タンパク質3、アンギオポエチン様タンパク質4、アンギオポエチン様タンパク質5、アンギオポエチン様タンパク質7、およびMfap4からなる群より選択されるアンギオポエチン様タンパク質を含む無血清培地中で培養するステップを含んでなり、その場合、少なくとも１つの一次細胞が１以上の血液細胞型に分化できることを特徴とする前記方法。
【請求項２０】
培地が無血清培地である、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
培地がさらに、インスリン成長因子（IGF）、繊維芽細胞成長因子（FGF）、トロンボポエチン（TPO）、および幹細胞因子（SCF）からなる群より選択される少なくとも１つのさらなる因子を含む、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
１以上の一次細胞が骨髄球、臍帯血細胞、および胎児肝細胞からなる群より選択される、請求項１９に記載の方法。
【請求項２３】
１以上の一次細胞がヒト細胞である、請求項１９に記載の方法。
【請求項２４】
１以上の一次細胞がマウス細胞である、請求項１９に記載の方法。
【請求項２５】
さらに、細胞を培養する前にアンギオポエチン様タンパク質と結合する細胞を選択するステップを含んでなる、請求項１９に記載の方法。
【請求項２６】
さらに、細胞を培養した後に、$Sca\text{-}1^{+}$、$CD45^{+}$、$IGF2\text{-}hFC^{+}$、$CD31^{+}$、およびKit^{+}からなる群より選択される少なくとも１つのポジティブな細胞表面マーカーを発現する、および／または、PrP、Lin、およびCD62Lからなる群より選択される少なくとも１つのネガティブな細胞表面マーカーを発現しない細胞を選択するステップを含んでなる、請求項１９に記載の方法。
【請求項２７】
造血幹細胞を増殖する方法であって、少なくとも１つのヒト細胞を少なくとも５日間、アンギオポエチン様タンパク質5を含む無血清培地中で培養するステップを含んでなり、その場合、少なくとも１つのヒト細胞が１以上の血液細胞型に分化できることを特徴とする前記方法。
【請求項２８】
培地が無血清培地である、請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】
培地がさらに、インスリン成長因子（IGF）、繊維芽細胞成長因子（FGF）、トロンボポエチン（TPO）、および幹細胞因子（SCF）からなる群より選択される少なくとも１つのさらなる因子を含む、請求項２７に記載の方法。
【請求項３０】
１以上のヒト細胞が骨髄球および臍帯血細胞からなる群より選択される、請求項２７に記載の方法。
【請求項３１】
造血幹細胞を個体に投与する方法であって：
a)個体からまたはドナーから造血幹細胞を得るステップ；
b)アンギオポエチン様タンパク質を含む培地中で造血幹細胞を培養するステップ、および
c)培養した細胞を個体中に移植するステップ

を含んでなる前記方法。
【請求項３２】
培地が無血清培地である、請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
アンギオポエチン様タンパク質がアンギオポエチン様タンパク質2、アンギオポエチン様タンパク質、アンギオポエチン様タンパク質4、アンギオポエチン様タンパク質5、アンギオポエチン様タンパク質7、およびMfap4からなる群より選択される、請求項３１に記載の方法。
【請求項３４】
アンギオポエチン様タンパク質が約0.1ng/mL～約500ng/mの濃度で存在する、請求項３１に記載の方法。
【請求項３５】
アンギオポエチン様タンパク質を遺伝子組換えにより産生させる、請求項３１に記載の方法。
【請求項３６】
アンギオポエチン様タンパク質がグリコシル化されている、請求項３１に記載の方法。
【請求項３７】
少なくとも１つのアンギオポエチン様タンパク質と結合する細胞について細胞の集団をスクリーニングするステップを含んでなる、造血幹細胞を同定する方法。
【請求項３８】
アンギオポエチン様タンパク質がアンギオポエチン様タンパク質2、アンギオポエチン様タンパク質、アンギオポエチン様タンパク質4、およびアンギオポエチン様タンパク質5からなる群より選択される、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
a）造血幹細胞を培養するのに好適な培地、および
b）少なくとも１つのアンギオポエチン様タンパク質.
を含んでなる、造血幹細胞をin vitroで増殖するためのキット。
【請求項４０】
培地が無血清培地である、請求項３９に記載の方法。
【請求項４１】
アンギオポエチン様タンパク質がアンギオポエチン様タンパク質2およびアンギオポエチン様タンパク質3からなる群より選択される、請求項３９に記載の方法。
【請求項４２】
アンギオポエチン様タンパク質がアンギオポエチン様タンパク質4およびアンギオポエチン様タンパク質5からなる群より選択される、請求項３９に記載の方法。
【請求項４３】
アンギオポエチン様タンパク質がアンギオポエチン様タンパク質7およびMfap4からなる群より選択される、請求項３９に記載の方法。
【請求項４４】
アンギオポエチン様タンパク質が約0.1ng/mL～約500ng/mlの濃度で存在する、請求項３９に記載の方法。
【請求項４５】
アンギオポエチン様タンパク質を遺伝子組換えにより産生させる、請求項３９に記載の方法。
【請求項４６】
アンギオポエチン様タンパク質がグリコシル化されている、請求項４５に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、合衆国政府より認可番号R01 DK 067356-01および075/P-IRFTのもとで支援を

受け、the National Institutes of Healthによる奨学金を受けて行われたものであって、合衆国政府は本発明についてある特定の権利を有する。

【背景技術】

【０００２】

造血幹細胞（HSC）は増殖と分化を介して造血系の全細胞を生じる。多能性HSCは疾患治療法の理想的な候補であると考えられ、遺伝子および遺伝子産物を送達する魅力的な標的として役立つ。かかるHSCを大量に入手する手段を有することが所望される；あいにく、造血幹細胞はそれが見出される骨髄および臍帯血などの組織中に極めて僅かな量しか存在しない。それ故に、造血細胞を拡大する一方、幹細胞の多能性を維持できるex vivo細胞培養系の方法を改善する必要性がある。

【０００３】

HSCのex vivo拡大の困難性が、HSCの臨床上の利用ならびにその生物学的特性の研究を著しく妨げてきた。自己再生を刺激するまたアポトーシスを防止できる新しいタンパク質因子の同定は、培養におけるHSC（長期HSC（LT-HSC）を含む）の数を増加するために必須の方法である。

【発明の開示】

【０００４】

本発明の概要

本明細書に記載した通り、アンギオポエチン様タンパク質はHSCの拡大を促進する。本発明の結果、造血幹細胞をin vitroでさらに多数に拡大することができる。

【０００５】

本発明は、造血幹細胞をin vitroで増殖する方法であって、１以上の細胞をアンギオポエチン様タンパク質を含む培地中で培養するステップを含んでなり、その場合、少なくとも1つの細胞が１以上の血液細胞型に分化できることを特徴とする前記方法を含む。一実施形態においては、幹細胞を含有する細胞の一集団を、１以上のアンギオポエチン様タンパク質の有効量を含有する培地中で該細胞を拡大するのに十分な条件のもとで培養する。さらに特別な実施形態において、造血幹細胞を増殖する方法は、１以上の一次細胞を少なくとも５日間、アンギオポエチン様タンパク質を含んでなる無血清培地中で培養するステップを含んでなる。前記アンギオポエチン様タンパク質は、例えば、アンギオポエチン様タンパク質2、アンギオポエチン様タンパク質3、アンギオポエチン様タンパク質4、アンギオポエチン様タンパク質5、アンギオポエチン様タンパク質7、またはMfap4であってもよい。他の実施形態において、造血幹細胞を増殖する方法は、少なくとも１つの一次細胞を少なくとも５日間、アンギオポエチン様タンパク質2、アンギオポエチン様タンパク質3、アンギオポエチン様タンパク質4、アンギオポエチン様タンパク質5、アンギオポエチン様タンパク質7、またはMfap4からなる群より選択されるアンギオポエチン様タンパク質を含む無血清培地中で培養するステップを含んでなり、その場合、少なくとも１つの一次細胞が１以上の血液細胞型に分化できることを特徴とする。さらに他の実施形態において、造血幹細胞を増殖する方法は、少なくとも１つのヒト細胞を少なくとも５日間、アンギオポエチン様タンパク質5を含んでなる無血清培地中で培養するステップを含んでなり、その場合、少なくとも１つのヒト細胞が１以上の血液細胞型に分化できることを特徴とする。

【０００６】

本発明の培養幹細胞には、造血幹細胞、内皮前駆細胞、骨髄間質幹細胞、間葉幹細胞、胚幹（ES）細胞および骨格筋幹細胞が含まれる。造血幹細胞が特に好ましい。

【０００７】

HSCは、HSCを含有するまたは発生する能力を有するいずれの細胞または細胞集団から培養してもよい。細胞集団は少なくとも0.1%の造血幹細胞を含有してもよい。ある実施形態においては、前記１以上の細胞は一次細胞である。典型的には、一次細胞は組織から直接、取得する。一次細胞を取得する方法は当技術分野で周知である。

【０００８】

他の実施形態において、前記１以上の細胞は、全骨髄、臍帯血細胞、動員末梢血幹細胞、または胎児肝細胞を含んでもよい。他の実施形態において、前記１以上の細胞はサイドポピュレーション（SP）細胞を含む。さらに他の実施形態において、前記１以上の細胞はSP Sca1$^+$ CD45$^+$骨髄細胞の単離された集団を含む。他の実施形態において、培養細胞の集団はCD34$^+$臍帯血細胞、AC133$^+$（prominin）臍帯血細胞、CD34$^+$動員末梢血幹細胞、またはAC133$^+$動員末梢血幹細胞を含んでもよい。さらに他の実施形態において、前記１以上の細胞はヒト骨髄CD34$^+$およびAC133$^+$細胞であってもよい。他の濃縮された造血幹細胞の集団を用いてもよい。胚幹細胞も用いることができる。

【０００９】

前記１以上の細胞を少なくとも5日間培養してもよい。他の実施形態においては、前記１以上の細胞を少なくとも10日間、または少なくとも2週間、または少なくとも4週間培養してもよい。

【００１０】

細胞を培養するために用いる培地は無血清培地を含んでもよい。培地は、１以上のサイトカインなどのさらなる因子の有効量を含んでもよい。好適な因子には、細胞の拡大に十分な条件のもとで、インスリン様成長因子（IGF）ならびに繊維芽細胞成長因子（FGF）、トロンボポエチン（TPO）および幹細胞因子（SCF）の少なくとも１つが含まれる。ある特定の実施形態においては、前記因子の少なくとも２つが含まれる。さらなる実施形態においては、前記因子の少なくとも３つが含まれる。

【００１１】

他の実施形態において、拡大されたHSCは最初の幹細胞またはHSCの多能性の少なくともいくつかを保持する。多能性には、他の血液細胞型に分化する能力などの幹細胞活性または潜在能、または分化せずに増殖する能力が含まれる。

【００１２】

他の実施形態において、造血幹細胞の拡大を促進する方法はさらに、Sca-1$^+$、IGF2-hFC$^+$、CD31$^+$、およびKit$^+$からなる群より選択される少なくとも１つのポジティブ細胞表面マーカーを発現するおよび／またはPrP、Lin、およびCD62Lからなる群より選択される少なくとも１つのネガティブ細胞表面マーカーを発現しない培養後の細胞（例えば、培養細胞）を選択するステップを含んでなる。他の態様において、培養細胞は少なくとも２つのポジティブ細胞表面マーカーを発現しかつ少なくとも２つのネガティブ細胞表面マーカーを発現しない。他の態様において、培養細胞は少なくとも３つのポジティブ細胞表面マーカーを発現しかつ少なくとも３つのネガティブ細胞表面マーカーを発現しない。

【００１３】

他の実施形態において、培養細胞はSca-1$^+$、IGF2-hFC$^+$、CD31$^+$およびKit$^+$を発現しかつPrP、Lin、およびCD62Lを発現しない。他の実施形態において、Sca-1$^+$およびIGF2-hFC$^+$を発現しかつPrP、Lin、およびCD62Lを発現しない。さらに他の実施形態において、造血幹細胞の拡大を促進する方法は、アンギオポエチン様タンパク質と特異的に結合する培養後の細胞を選択するステップを含んでなる。

【００１４】

本発明の一実施形態は、造血細胞の数の拡大を必要とする個体において造血幹細胞の拡大を促進する方法であって、前記個体にアンギオポエチン様タンパク質を、造血幹細胞の拡大を促進するのに有効な量で投与し、それにより個体において造血幹細胞の拡大を促進するステップを含んでなる前記方法を提供する。ある実施形態においては、個体において造血幹細胞の拡大を促進するための投与は注入による。

【００１５】

ある実施形態において、個体が造血幹細胞の数の拡大を必要とするのは、限定されるものでないが、造血機能の低下、免疫機能の低下、好中球数の低下、好中球動員の低下、末梢血前駆細胞の動員、敗血症、重症の慢性好中球減少、骨髄移植、感染性疾患、白血球減少症、血小板減少症、貧血、移植中の骨髄移植促進、照射治療における骨髄回復の促進、化学もしくは化学治療誘導性骨髄形成不全または骨髄抑制、および後天性免疫不全症候群

を含む症状の存在による。

【００１６】

本発明はまた、化学療法を受けた哺乳動物の造血回復を促進する方法であって、哺乳動物の造血幹細胞の拡大を促進するのに有効なアンギオポエチン様タンパク質の量を哺乳動物に投与するステップを含んでなり、それにより、化学療法を受けた哺乳動物のて造血回復を促進する前記方法を提供する。

【００１７】

本発明は造血幹細胞を個体に投与する方法を描く。ある実施形態において、その方法は個体からまたはドナーから造血幹細胞を得るステップ、アンギオポエチン様タンパク質を含む培地中で細胞を培養するステップ、および培養した細胞を個体中に移植するステップを含んでなる。

【００１８】

本発明はまた、造血幹細胞に基づく療法を必要とする個体を治療する方法であって、個体からまたはドナーから造血幹細胞を取り出すステップ、造血幹細胞の拡大を促進するのに有効なアンギオポエチン様タンパク質の量を含有する培地中で細胞を培養するステップ、培養した細胞を収穫するステップ、および培養した細胞を個体中に移植するステップを含んでなる前記方法を提供する。

【００１９】

本発明はまた、個体に遺伝子を送達しかつ発現する方法であって、個体からまたはドナーから造血幹細胞を取り出すステップ、造血幹細胞の拡大を促進するのに有効なアンギオポエチン様タンパク質の量を含有する培地中で細胞を培養するステップ、培養した細胞を収穫するステップ、および培養した細胞を個体中に移植するステップを含んでなる前記方法を提供する。

【００２０】

本発明の他の実施形態は、アンギオポエチン様タンパク質に対する受容体をスクリーニングする方法であって、候補タンパク質のライブラリーまたは候補タンパク質をコードする遺伝子のライブラリーをスクリーニングして、アンギオポエチン様タンパク質と結合するおよび／または培養において造血幹細胞の拡大を促進するタンパク質を同定するステップを含んでなり、その場合、アンギオポエチン様タンパク質と結合する候補タンパク質はアンギオポエチン様タンパク質に対する受容体であることを示す前記方法を提供する。

【００２１】

本発明はまた、造血幹細胞を同定する方法も提供する。ある実施形態においては、前記方法は少なくともアンギオポエチン様タンパク質と結合する細胞をスクリーニングするステップを含んでなる。他の実施形態においては、造血幹細胞をスクリーニングするステップはさらに、上記のように、少なくとも１つのポジティブ細胞表面マーカーを発現するおよび／または少なくとも１つのネガティブ細胞表面マーカーを発現しない細胞を選択するステップを含んでなる。

【００２２】

本発明はまた、造血幹細胞を同定するためのキットも含む。前記キットは少なくとも１つの、検出可能なように標識されたアンギオポエチン様タンパク質を含む。アンギオポエチン様タンパク質はエピトープ、蛍光色素、または放射性標識などのいずれかの好適な検出可能な標識を用いて標識してもよい。好適なエピトープには、FLAGタグ、mycタグ、および特異的抗体を作りうるかまたは入手しうる他のエピトープが含まれる。好適な蛍光色素には、フルオレセイン、ローダミン、Cy3、およびCy5が含まれる。好適な放射性ラベルには、例えば、^{125}I、^{32}P、および^{35}Sが含まれる。エピトープ標識、蛍光色素および放射標識などの検出可能な標識を利用する方法は当技術分野で周知である。

【００２３】

造血幹細胞をex vivo（例えば、in vitro）で増殖するためのキットも提供される。キットは、HSCを培養するために好適な培地、１以上のアンギオポエチン様タンパク質を含んでもよく、そして、場合により造血幹細胞をin vitroで拡大するための指示書が含まれ

る。
【００２４】
本明細書に記載の様々な実施形態は補足的であってもよいし、また本明細書に含まれる技術の視点で当業者が理解しうる方式で組合せてもまたは一緒に使ってもよい。
【発明を実施するための最良の形態】
【００２５】
詳細な説明
本明細書に記載の通り、新しく単離したHSCならびに培養したHSCはアンギオポエチン様タンパク質と結合する。さらに、本明細書に記載の通り、アンギオポエチン様タンパク質は造血幹細胞の拡大を促進する。本発明は造血幹細胞、造血幹細胞を増殖または拡大する方法、および増殖した造血幹細胞を用いる方法に関する。
【００２６】
造血幹細胞のex vivo培養
本発明は、培養における（例えば、in vitroまたはex vivo）造血幹細胞（HSC）の拡大を促進する方法を提供する。細胞または培養する細胞は１以上の血液細胞型に分化できるいずれの細胞を含んでもよい。例示の血液細胞型を図14に示したが、これには食作用免疫細胞（例えば、顆粒球）、単球（例えば、マクロファージ前駆体細胞）、マクロファージ、好酸球、赤血球、血小板形成細胞（例えば、巨核球）、Tリンパ球、Bリンパ球、およびナチュラルキラー（NK）細胞が含まれる。好適な細胞はまた、自己更新することもできる、すなわち、増殖しまたは数を増やしそして親細胞と同じ発生段階にとどまることができる。
【００２７】
好適な細胞は、例えば、限定されるものでないが、骨髄、動員末梢血（MPB）、胎児肝、および臍帯血を含む造血幹細胞のいずれの公知の供給源から単離してもよい。臍帯血は、例えば、Issaragrishiら，N. Engl. J. Med. 332：367-369 （1995）で考察されている。骨髄細胞は、限定されるものでないが、腸骨（例えば、腸骨稜を経由して寛骨から）、脛骨、大腿、脊椎動物、または他の骨腔を含む骨髄の供給源から得てもよい。幹細胞の他の供給源は、限定されるものでないが、ES細胞、胚卵黄嚢、胎児肝、および胎児脾を含む。
【００２８】
細胞は造血幹細胞をさらに濃縮する方法で処理してもよい。造血幹細胞を、特異的な幹細胞マーカーを用いて単離する方法は当業者に公知である。
【００２９】
本発明の１以上の細胞および造血細胞は、いずれの好適な動物、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、ブタまたはマウスから誘導してもよい。好ましい一実施形態において、細胞はヒト細胞である。
【００３０】
骨髄を単離するために、限定されるものでないが、場合により胎児ウシ血清（FCS）または他の天然諸因子を補充した塩水溶液を含む適当な溶液を、許容されるバッファーと一緒に用いて、骨を洗い流してもよい。ある実施形態においては、バッファーは通常、約5～約25mMの低濃度である。好都合なバッファーには、限定されるものでないが、HEPES、リン酸バッファーおよび乳酸バッファーが含まれる。骨髄はまた、通常の技法によって、骨から吸引してもよい。
【００３１】
系統特異的マーカーについては、系統特異的マーカーの非存在または低発現を、系統特異的マーカーに特異的な抗体との結合を欠くことにより同定してもよく、この技法はいわゆる"ネガティブ選択"に有用である。本発明の方法に用いる細胞の供給源をネガティブ選択技法で処理し、系統特異的マーカーを発現する細胞を取除いて、系統ネガティブである細胞（"Lin^-"）を保持することができる。Lin^-は一般的に、T細胞（CD2、3、4および8など）、B細胞（B220、CD48、CD10、19および20など）、骨髄細胞（Mac-1、Gr-1、CD14、15

、16および33など）、ナチュラルキラー（NK）細胞（CD244、CD2、16および56など）、RBC（Ter119、およびグリコホリンAなど）、巨核球（CD41）、肥満細胞、好酸球または好塩基球などに関連するマーカーを欠く細胞を意味する。ネガティブ選択する方法は当技術分野で公知である。系統特異的マーカーにはまた、CD38、HLA-DRおよびCD71が含まれる。本明細書に用いられる、「Lin^-」は、少なくとも１つの系統特異的マーカーの発現を欠くことに基づいて選択される細胞集団を意味する。

【００３２】

様々な技法を使って、最初に定められた系統のまたは特別な表現型を有する細胞を取り出すことにより細胞を分離することができる。モノクローナル抗体は、特別な細胞系統、分化の段階、または特別な表現型に関連するマーカーを同定するのに特に有用である。抗体を固体支持体に接着させて粗分離できるようにしてもよい。使用する分離技法は採集する画分中の生細胞の保持を最大にしなければならない。色々な効果を有する様々な技法を使って「相対的に粗い」分離物を得てもよい。かかる分離は、10％までであり、通常、マーカーを有しない存在する全細胞の約5％以下が保持される細胞集団と共に残りうる。ある特定の実施形態においては、保持される細胞の集団中に存在する全細胞の約1％以下がマーカーを有しない。使われる特別な技法は、分離効率、関連する細胞傷害性、実行の容易さと速度、および精巧な設備の必要性および／または技能に依存しうる。

【００３３】

分離の手順は、限定されるものでないが、物理的分離、抗体をコートした磁性ビーズを用いる磁性分離、アフィニティクロマトグラフィ、モノクローナル抗体と結合したまたはモノクローナル抗体と併用される細胞傷害薬（限定されるものでないが、補体および細胞毒を含む）、ならびに固体マトリックス、例えば、プレートに接着した抗体による「パニング」、溶出またはいずれの他の好都合な技法を含んでもよい。ある特定の実施形態においては、色々な細胞を速やかにスクリーニングしかつ分離するハイスループット技法を利用する。

【００３４】

物理的分離技法の使用は、限定されるものでないが、物理特性（密度勾配遠心分離および向流遠心溶出）、細胞表面（レクチンおよび抗体アフィニティ）、および生体染色特性（ミトコンドリア結合色素rho123およびDNA結合色素Hoechst 33342）の差に基づく技法の使用を含む。

【００３５】

正確かつ速やかな分離を可能にする技法は、限定されるものでないが、フローサイトメトリー（例えば、蛍光活性化細胞ソーティング）を含み、この技法は、様々な精巧度、例えば、複数のカラーチャネル、低角度および鈍い光散乱検出チャネル、インピーダンスチャネルチャネルを有しうる。細胞はまた、光散乱特性に基づくフローサイトメトリーにより選択してもよく、その場合、幹細胞は低い側方散乱および低～中の前方散乱プロファイルに基づく。サイトスピン調製物は、成熟リンパ球と成熟顆粒球の間のサイズを有する幹細胞の濃縮物を示す。

【００３６】

例えば、第1分離ステップで抗-CD34を第1の蛍光色素により標識しうる一方、様々な定められた系統を、第1の蛍光色素と異なりかつ識別しうる分光的特徴をもつ蛍光と結合させてもよい。それぞれの系統を１以上の「分離」ステップで分離しうるが、系統を1つがHSCをポジティブ選択するように、同時に分離することが望ましい。細胞は、死細胞に関連する色素（限定されるものでないが、ヨウ化プロピジウム（PI）を含む）を使うことにより、死細胞から選択しかつ単離することができる。特別な分離の順序は本発明にとって重要でない。

【００３７】

上記のように取得した細胞を直接用いてもよいし、または液体窒素温度で凍結して長期間貯蔵し解凍して再使用してもよい。いったん解凍すれば、細胞を本明細書に記載の方法を用いて拡大することができる。

【００３８】
HSCは、１以上の細胞を拡大容器中でおよびある体積の好適な培地中で培養することにより拡大することができる。幹細胞の高濃縮された細胞集団、およびそれらを得る方法は、WO 95/05843；WO 95/03693およびWO 95/08105に記載されている。ある好ましい実施形態において、前記１以上の細胞は造血幹細胞の実質的に濃縮された細胞の集団を含む。他の実施形態においては、細胞集団は間質細胞を実質的に含まない。
【００３９】
細胞を、培養ウエルが1ウエル当たり約1～100の細胞を含有するように培養してもよい。細胞の集団が骨髄である場合、細胞を約$1x10^2$細胞～約$1x10^7$細胞/培地mLの密度で培養してもよい。他の実施形態においては、細胞を約$1x10^5$細胞～約$1x10^6$細胞/培地mLの密度で培養してもよい。他の実施形態においては、細胞の集団はサイドポピュレーション（SP）骨髄細胞を含む。SP骨髄細胞はより低い密度、例えば、約$1x10^2$～$5x10^3$細胞/mlで培養することができる。別の実施形態において、細胞の集団は動員末梢血由来であってもよい。動員末梢血細胞を約20,000細胞/mL～約50,000細胞/mLの密度で培養してもよい；他の実施形態においては、動員末梢血細胞を約50,000細胞/mLの密度で培養する。
【００４０】
いずれの好適な拡大容器、フラスコ、または適当なチューブ、例えば12、24または96ウエルプレート、12.5cm^2 Tフラスコまたは通気性バッグを、本発明の方法に用いてもよい。かかる培養容器はFalcon、CorningまたはCostarから市販されている。本明細書で使用する「拡大容器」はまた、いずれの細胞を拡大するためのチャンバーまたは容器も含み、自立しているかまたは拡大装置に組み込まれていてもよいしまたはそうでなくてもよいと意図する。
【００４１】
幹細胞を拡大するために様々な培地を用いることができ、それには、Dulbecco's MEM、IMDM、X-Vivo 15（血清枯渇した、Cambrex）、RPMI-1640およびStemSpan（Stem Cell Technologies）が含まれる。他の実施形態においては、細胞培地は無血清である。本発明の方法に用いることができる無血清培地は無血清StemSpan（Stem Cell Technologies）である。他の実施形態においては、培地に10μg/mlヘパリンが補充される。
【００４２】
HSCを拡大するための培地処方は、約0.1ng/mL～約500ng/mLの範囲の濃度の１以上のアンギオポエチン様タンパク質を含有する。他の実施形態においては、約1ng/mL～約100ng/mLの範囲の１以上のアンギオポエチン様タンパク質を用いる。他の実施形態においては、約10ng/ml～50ng/mlの範囲の１以上のアンギオポエチン様タンパク質を用いる。アンギオポエチン様タンパク質の他の有用な濃度は、当業者により、本明細書に含まれる教示を用いて容易に決定されうる。
【００４３】
他の態様においては、本発明のアンギオポエチン様タンパク質に加えて、HSCを拡大するための培地処方にサイトカインが補充され、かかるサイトカインには、限定されるものでないが、繊維芽細胞成長因子（FGF）（例えばFGF-1またはFGF-2）、インスリン成長因子（例えばIGF-2、またはIGF-1）、トロンボポエチン（TPO）、および幹細胞因子（SCF）が含まれる。以上に示したように、サイトカインの濃度は約0.1ng/mL～約500ng/mLの範囲である。他の実施形態においては、約1ng/mL～約200ng/mLのサイトカインを用いる。他の実施形態においては、約10ng/ml～100ng/mlのサイトカインを用いる。他の実施形態において、本発明に用いるサイトカインはFGF-1、TPO、IGF-2、およびSCFである。さらに他の実施形態においては、SCFが10ng/ml濃度で、TPOが20ng/ml濃度で、IGF-2が20ng/ml濃度で、そしてFGF-1が10ng/ml濃度で存在する。他のサイトカインを、単独でまたは組み合わせて加えることができ、それらのサイトカインには、限定されるものでないが、G-CSF、GM-CSF、IL-1αおよびIL-11が含まれる。サイトカインの他の有用な濃度は、当業者により、本明細書に含まれる教示を用いて容易に決定されうる。
【００４４】

移植

本発明の拡大培養された造血幹細胞は様々な応用に用いることができ、かかる応用には、細胞に基づく療法または細胞置換療法と呼ばれることもある骨髄移植、遺伝子療法、組織工学、およびin vitro器官形成などの移植が含まれる。

【００４５】

骨髄移植のための造血前駆細胞拡大は、可能性のあるヒト骨髄培養の応用である。ヒト自己および同種間骨髄移植は、現在、白血病、リンパ腫、およびその他の生命を脅かす疾患などのの治療法として利用されている。しかしこれらの方法は移植のために十分な細胞が存在するのを確かなものにするため、大量のドナー骨髄を取り出さねばならない。本発明の方法はこの問題を巧みに回避する。移植方法は当業者に公知である。

【００４６】

拡大された造血幹細胞は、被験者の造血幹細胞を再構成するためにまたは所望の造血細胞型が濃縮された細胞集団を提供するために好適である。この方法は、静脈内注入または粘膜の注入などの標準手法により、拡大された培養細胞を患者に投与することに関わる。

【００４７】

細胞をex vivoで拡大して静脈内に投与できるという発見は、全身投与の手法を提供する。例えば、骨髄由来の幹細胞を比較的容易に単離でき、単離した細胞を本発明の方法により培養し、利用しうる細胞数を増加できる。静脈内投与はまた、他の投与方式より高いレベルの容易さ、便宜性および心地よさを与える。ある特定の応用においては、静脈内注入による全身投与は全体的により効果的である。他の実施形態においては、幹細胞を上腸間膜動脈または腹腔動脈中に注入することによって個体に投与する。細胞はまた、レシピエントの気道を灌注降下することによりまたは腸粘膜中に直接注入することにより局所に送達することができる。

【００４８】

細胞を単離した後に、細胞が所望の数まで所望の機能的特徴を失うことなく拡大できるように、細胞をある期間培養してもよい。例えば、細胞を1日～1年以上培養してもよい。他の実施形態においては、細胞を3～30日間拡大する。他の実施形態においては、4～14日間拡大する。さらに他の実施形態においては、細胞を少なくとも7日間拡大する。

【００４９】

1注入当たり、ヒト体重100kg当たり10^5～10^{13}細胞を投与する。他の実施形態においては、ヒト体重100kg当たり約$1x10^8$～約$5x10^{12}$細胞を静脈内に輸液する。他の実施形態においては、ヒト体重100kg当たり約$1x10^9$～約$5x10^{11}$細胞を静脈内に輸液する。例えば、ヒト体重100kg当たり約$4x10^9$細胞、ヒト体重100kg当たり約$2x10^{11}$細胞を輸液してもよい。

【００５０】

いくつかの実施形態においては、細胞の単投与を提供する。他の実施形態においては、複数投与が用いられる。複数投与は周期的時点にわたって与え、例えば、3～7 連続日の最初の治療体制、次いで他の時点でこれを繰り返してもよい。

【００５１】

患者に投与される細胞の有効量は、数百以下から数百万以上の範囲であってもよい。特定の実施形態において、有効量は10^3～10^8の範囲であってもよい。投与すべき細胞の数は、限定されるものでないが、医療生物学者に馴染みのある他の因子のなかでも、治療すべきサイズまたは全体積/表面積を含む治療すべき障害の特性、ならびに治療すべき領域の位置に対する投与部位の近接性に応じて変わりうることは理解されるであろう。

【００５２】

用語、有効な期間（または時間）および有効な条件は、薬剤または医薬組成物がその意図する結果を達成するために必要なまたは好ましい期間もしくは時間または他の制御可能な条件（例えば、in vitroの方法に対する温度、湿度）を意味する。

【００５３】

用語、製薬上許容される担体（または培地）は用語「生物学的に適合しうる担体または培地」と互換的に使うことができ、健全な医学的判断の範囲内で、ヒトおよび動物の組織

と接触して、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、または他の合併症なしに、納得の行く便益／リスク比の釣り合いがとれていて用いるのに好適である、試薬、細胞、化合物、物質、組成物、および／または投与剤形を意味する。本明細書にさらに詳しく記載した通り、本発明の使用に好適な製薬上許容される担体は、半固体（例えば、ゲル）および固体物質（例えば、細胞骨格）を含む。本明細書に使用される、用語、生分解性は、物質のin vivoで破壊される（例えば、分解される、侵食される、溶解される）能力を記載する。この用語は、身体からの消失を伴うまたは伴わない（例えば、再吸収）in vivoでの分解を含む。半固体および固体物質は身体内の分解に抵抗するように（非生分解性）設計できるしまたは身体内で分解するように（生分解性、生被侵食）に設計できる。生分解性物質はさらに生体再吸収性または生体吸収性であってもよく、例えば、体液中に溶解してもまた吸収されて（水溶性移植片が一例である）、または他の物質への変換によりまたは自然経路を介して分解および消失により、分解して最後は身体から消失してもよい。

【００５４】

細胞に基づく療法または細胞置換療法としても知られる移植療法について、本明細書では、いくつかの用語が使用される。用語、自己導入、自己移植、自家移植などは、細胞ドナーが細胞置換療法のレシピエントでもある治療を意味する。用語、同種間移動、同種間移植、同種移植片などは、細胞ドナーが細胞置換療法のレシピエントと同じ腫であるが、同じ個体ではない場合の治療を意味する。ドナーの細胞がレシピエントと組織適合的に整合している細胞導入は同系の導入と呼ばれることがある。用語、異種間導入、異種間移植、異種移植などは細胞ドナーが細胞置換療法のレシピエントと異なる種である場合の治療を意味する。

【００５５】

拡大した造血細胞は、限定されるものでないが、照射治療および化学療法などの治療後の免疫無防備状態の宿主における全範囲の造血細胞を再構成するために用いることができる。かかる療法は、意図的にまたは骨髄移植またはリンパ腫、白血病および他の新生物症状、例えば乳癌の治療の副作用として、造血細胞を破壊する。

【００５６】

拡大した造血細胞はまた、特定の造血性系統に対する細胞の供給源としても有用である。拡大した造血細胞の１以上の選択された系統への成熟、増殖および分化は、細胞を適当な因子、例えば、限定されるものでないが、エリスロポエチン（EPO）、コロニー刺激因子、例えば、GM-CSF、G-CSF、またはM-CSF、SCF、インターロイキン、例えば、IL-1、-2、-3、-4、-5、-6、-7、-8、-13、などとともに、または間質細胞または幹細胞再生、コミットメント、および分化に関わる因子を分泌する他の細胞とともに培養することを介して行うことができる。

【００５７】

薬物発見

拡大された本発明の造血細胞は、培養条件または生物学的修飾因子、例えば、自己再生、増殖、関与、分化、および成熟として、幹細胞のかかる生物学的応答を促進または阻害する成長因子を同定するために有用である。この方法でまた、例えば、これらの生物学的修飾因子の受容体、生物学的改変因子とその受容体の相互作用を妨害する薬剤、およびポリペプチド、アンチセンスポリヌクレオチド、小分子、または遺伝子転写または翻訳に影響を与える環境刺激を同定することもできる。

【００５８】

例えば、本発明は、様々な造血系統への幹細胞の分化についてのアッセイに用いる比較的多数の造血幹細胞を調製することを可能にする。これらのアッセイを、例えば、幹細胞自己再生、関与、または分化を促進または阻害する因子のような物質を同定する目的に容易に適合させることができる。

【００５９】

本発明は、アンギオポエチン様タンパク質に対する受容体を同定する方法を提供する。これらのオーファンリガンドに対する受容体はまだ同定されてない。

【００６０】
従って、本発明は、アンギオポエチン様タンパク質に対する受容体をスクリーニングする方法であって、候補タンパク質のライブラリーまたは候補タンパク質をコードする遺伝子のライブラリーをスクリーニングしてアンギオポエチン様タンパク質と結合するおよび／または培養中で造血幹細胞の拡大を促進するタンパク質を同定することを含んでなる前記方法を提供する。ある実施形態においては、候補遺伝子のライブラリーを目的のアンギオポエチン様タンパク質と通常結合しない細胞中に導入しかつ発現させる。次いでこれらの細胞を１以上のアンギオポエチン様タンパク質に曝してもよい。アンギオポエチン様タンパク質への暴露するとアンギオポエチン様タンパク質と結合するおよび／または拡大する細胞は、アンギオポエチン様タンパク質受容体を含有する細胞であることを示す。アンギオポエチン様タンパク質と結合するまたはその存在のもとで拡大する細胞を単離し、トランスフェクトされた遺伝子を細胞から単離することができる。

【００６１】
遺伝子クローニング計画
また、本発明の拡大された細胞を利用し、例えば、これらの生物学的事象に関連するまたは造血細胞型の特徴である標的抗原に特異的なモノクローナル抗体を用いて、サブトラクティブ・ハイブリダイゼーションによりまたは発現クローニングにより、その発現が幹細胞または他の造血細胞の増殖、関与、分化、および成熟に関連する遺伝子を同定しかつクローニングしてもよい。

【００６２】
遺伝子送達および発現
先に記載した通り、造血幹細胞はまた、被験者における遺伝子送達および発現の重要な標的でもある。1つのかかる実施形態は遺伝子治療と呼ばれることがある。

【００６３】
本発明によれば、その発現が個体に治療効果を有する遺伝子を導入する遺伝子治療のために細胞を個体に再導入する前に、培養し拡大する細胞をさらに遺伝子的に改変してしてもよい。遺伝子を培養細胞中に導入する方法を以下に詳しく説明する。

【００６４】
本発明のいくつかの態様においては、治療遺伝子を発現する細胞を、補充する、増加する、および／または欠陥のあるもしくは損傷した細胞と置換することにより、個体を治療することができる。細胞は、正常な整合したドナーの細胞からまたは治療する個体（すなわち、自己）から得た幹細胞から誘導することができる。正常な遺伝子を発現しうる形態で導入することにより、かかる欠損に苦しむ個体の遺伝的欠陥を補償しかつその症候群のいくつかまたは全てを除去し、軽減しまたは低減する手段を与えることができる。

【００６５】
発現ベクターを自己または同種間の拡大した造血細胞中に導入しかつ発現させてもよく、細胞のゲノムを、当技術分野で公知の方法により相同または非相同組換えにより改変してもよい。この方法で、個体中の遺伝的欠陥を是正するかまたは幹細胞に自然状態では欠ける遺伝的能力を与えることができる。 例えば、限定されるものでないが、β-地中海貧血症、鎌形赤血球貧血、アデノシンデアミナーゼ欠乏、リコンビナーゼ欠乏、およびリコンビナーゼ調節性遺伝子欠乏を含む疾患を、この方式で直すことができる。造血細胞に関連しない疾患、例えば、限定されるものでないが、ホルモン、酵素、および成長因子を含む分泌タンパク質の不足に関係する疾患も治療することができる。適当な調節開始領域の制御下で目的の遺伝子を誘導発現することにより、自然状態でタンパク質を通常産生する細胞と同様な方式でタンパク質の産生（および分泌）を可能にしうる。

【００６６】
同様に、拡大した造血細胞において、特別な遺伝子産物の発現または活性を阻害するリボザイム、アンチセンスRNAまたはタンパク質を発現することができる。限定されるものでないが、多重薬物耐性（MDR）遺伝子を含む薬物耐性遺伝子を細胞中に導入して例えば、それらが薬物療法に生存できるようにすることもできる。HIVまたはHTLV-I、およびHTL

VIIなどの血液栄養性病原体に対して、細胞を遺伝的に改変し、造血幹細胞または幹細胞から生じる分化細胞中の病原体の増殖を阻止しうるアンチセンスRNA、リボザイム、またはタンパク質を産生させることができる。限定されるものでないが、相同組換えによる直接的な置換、欠失、もしくはDNAの付加、またはアンチセンス配列による間接的な方法を含む、当技術分野で公知の方法により、特別な遺伝子配列の発現を無能化または調節することもできる。

【００６７】

造血幹細胞培養の形質導入

拡大される本発明の造血幹細胞を遺伝的に改変することができる。造血幹細胞中への遺伝子の導入は標準技法、例えば、感染、トランスフェクション、形質導入または形質転換によってもよい。遺伝子導入の方式の例には、例えば、はだかのDNA、$CaPO_4$沈降、DEAEデキストラン、エレクトロポレーション、プロトプラスト融合、リポフェクション、細胞マイクロインジェクション、およびウイルスベクター、アジュバント添加DNA、遺伝子銃、カテーテル、などが含まれる。他の実施形態においては、ウイルスベクターが利用される。

【００６８】

ポリヌクレオチドを当技術分野で周知の方法を用いてベクターゲノム中に挿入する。例えば、インサートおよびベクターDNAを、好適な条件下で、制限酵素と接触させて、お互いに対合しかつリガーゼにより一緒に結合された相補性末端をそれぞれの分子上に作製してもよい。あるいは、合成核酸リンカーを制限したポリヌクレオチドの末端とライゲートしてもよい。これらの合成リンカーは、ベクターDNA中の特別な制限部位に対応する核酸配列を含有する。さらに、終結コドンおよび適当な制限部位を含有するオリゴヌクレオチドをライゲートして、例えば、次のいくつかもしくは全てを含有するベクター中に挿入してもよい：選択マーカー遺伝子、例えば哺乳動物細胞中の安定なまたは一過性トランスフェクタントを選択するためのネオマイシン遺伝子；高レベルの転写のためのヒトCMVの最初期遺伝子からのエンハンサー／プロモーター配列；mRNA安定性のための、SV40からの転写終結およびRNAプロセシングシグナル；適当なエピソーム複製のためのSV40ポリオーマ複製起点およびColE1；多目的マルチクローニングサイト；およびセンスおよびアンチセンスRNAのin vitro転写のためのT7およびSP6 RNAプロモーター。他の手段も当技術分野では周知されかつ利用することができる。

【００６９】

造血幹細胞の改変は、導入されたトランスジーンの構成的または誘導的に発現するために作製された発現カセットの使用を含んでもよい。かかる発現カセットは、プロモーター、開始コドン、停止コドン、およびポリアデニル化シグナルなどの調節エレメントを含んでもよい。これらのエレメントは、個体への注入後に幹細胞から生じる細胞中の幹細胞において機能しうることが必要である。さらに、これらのエレメントは、タンパク質をコードするヌクレオチド配列と機能的に連結されていて、ヌクレオチド配列が幹細胞において発現されそしてタンパク質を産生することが必要である。開始コドンおよび停止コドンは一般的にタンパク質をコードするヌクレオチド配列の一部分であると考えられる。

【００７０】

様々なプロモーターを用いてトランスジーンを発現させることができる。遺伝子を発現させるプロモーターは当技術分野で周知である。プロモーターには、サイトメガロウイルス（CMV）中初期（intermediate early）プロモーター、ウイルスLTR、例えばRous肉腫ウイルスLTR、HIV-LTR、HTLV-1 LTR、サルのウイルス40（SV40）初期プロモーター、大腸菌lac UV5プロモーターおよび単純ヘルペスtkウイルスプロモーターが含まれる。例えば、組織特異的プロモーター、すなわちいくつかの組織内で機能するが他の組織内では機能しないプロモーターを用いてもよい。かかるプロモーターには、EF2応答プロモーターなどが含まれる。特定の細胞型に導入された配列の発現を起こすために用いることができるプロモーターの例には、T-細胞およびNK細胞における発現用のグランザイムA、幹および前駆細胞における発現用のCD34プロモーター、細胞傷害性T-細胞における発現用のCD8プロ

モーター、および骨髄細胞における発現用のCD11bプロモーターが含まれる。

【００７１】

制御可能なプロモーターを用いてもよい。かかる系には、lacオペレーターを保持する哺乳動物の細胞プロモーターからの転写を制御するために大腸菌由来のlacリプレッサーを転写モジュレーターとして用いる系（Brown, M. ら, Cell, 49：603-612 (1987)）、テトラサイクリンリプレッサー（tetR）を用いる系（Gossen, M.およびBujard, H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89：5547-5551 (1992)； Yao, F.ら, Human Gene Therapy, 9：1939-1950 (1998)； Shockelt, P.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA、92：6522-6526 (1995)）が含まれる。他の系には、FK506ダイマー、アストラジオール（astradiol）を用いるVP16もしくはp65、RU486、ジフェノールムリスレロン（diphenolmurislerone）またはラパマイシンが含まれる。誘導可能な系はInvitrogen、ClontechおよびAriadから入手しうる。リプレッサーをオペロンとともに用いる系を本発明に利用してもよい。標的細胞におけるトランスジーン発現の制御は遺伝子治療の重要な態様である。例えば、大腸菌からのlacリプレッサーは、lacオペレーターを保持する哺乳動物細胞プロモーターからの転写を調節するための転写モジュレーターとして機能しうるし（M. Brownら, Cell, 49：603-612 (1987)； GossenおよびBujard (1992)； M. Gossen ら, Natl. Acad. Sci. USA、89：5547-5551 (1992)）、tetR-哺乳動物の細胞転写アクチベーター融合タンパク質、tTa（tetR-VP16）を作製するために、テトラサイクリンリプレッサー（tetR）を転写アクチベーター（VP16）と併用してもよいし、哺乳動物の細胞中の遺伝子発現を制御するtetR-tetオペレーター系を作製するために、ヒトサイトメガロウイルス（hCMV）主要最初期プロモーター由来のtetOを保持する最小限プロモーターと併用してもよい。Yaoと共同研究者（F. Yaoら, Human Gene Therapy, 前掲）は、テトラサイクリンオペレーターがCMVIEプロモーターのTATAエレメント下流の適当な位置にある場合、tetR-哺乳動物の細胞転写因子融合誘導体よりも、むしろ、テトラサイクリンリプレッサー（tetR）が単独で強力なtrans-モジュレーターとして機能し、哺乳動物の細胞中の遺伝子発現を制御できることを実証した。このテトラサイクリン誘導性スイッチの特別な利点の１つは、その制御効果を達成するために、場合によっては細胞に対して毒性のあるテトラサイクリンリプレッサー-哺乳動物細胞トランス活性化因子またはリプレッサー融合タンパク質の使用を必要としない点である（M. Gossen ら, Natl. Acad. Sci. USA, 89：5547-5551 (1992)； P. Shockett ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92：6522-6526 (1995)）。

【００７２】

いくつかの誘導プロモーターの有効性は経時的に増加する。かかる場合には、複数のリプレッサーを直列に挿入する、例えば、TetRをIRESによりTetRに連結することによりかかる系の有効性を増強することができる。あるいは、所望の機能をスクリーニングする前に3日間待ってもよい。いくらかのサイレンシングが起こりうるとしても、それは多数の細胞を用いれば最小化される、例えば、もし少なくとも$1x10^4$～約$1x10^7$細胞を用いれば、サイレンシングの効果は最小化される。この系の有効性を増強する公知の手法により所望のタンパク質の発現を増強してもよい。例えば、Woodchuk肝炎ウイルス転写後制御エレメント（WPRE）を用いる。Loeb, V.E.ら, Human Gene Therapy 10：2295-2305 (1999)；Zufferey, R.ら, J. of Virol. 73：2886-2892 (1999)；Donello, J.E.ら, J. of Virol. 72：5085-5092 (1998)を参照されたい。

【００７３】

本発明を実施するために有用なポリアデニル化シグナルの例には、限定されるものでないが、ヒトコラーゲンIポリアデニル化シグナル、ヒトコラーゲンIIポリアデニル化シグナル、およびSV40ポリアデニル化シグナルが含まれる。

【００７４】

制御エレメントと機能的に連結されたトランスジーンを含む外因性遺伝物質は機能性細胞質分子、機能性エピソーム分子として細胞内に存在したままでもよいしまたは細胞の染色体DNAに組み込まれていてもよい。外因性遺伝物質は細胞中に導入され、そこでプラスミドの形態で別の遺伝物質としてとどまってもよい。あるいは、染色体中に組み込むこと

ができる直鎖DNAを細胞中に導入してもよい。DNAを細胞中に導入するときに、染色体中へのDNA組込みを促進する試薬を加えてもよい。組込みを促進するのに有用であるDNA配列もDNA分子中に含ませることができる。あるいはRNAを細胞中に導入してもよい。

【００７５】

選択マーカーを用いて所望の遺伝子の本発明の造血幹細胞中への取込みをモニターすることができる。これらのマーカー遺伝子はいずれかのプロモーターまたは誘導プロモーターの制御下にあってもよい。これらは当技術分野で周知であって、栄養分、抗生物質などの刺激に対する細胞の感受性を変化させる遺伝子を含む。遺伝子にはneo、puro、およびtk、多剤耐性 （MDR）などに対する遺伝子が含まれる。他の遺伝子は、緑色蛍光タンパク質（GFP）、青色蛍光タンパク質（BFP）、ルシフェラーゼ、およびLacZなどの容易にスクリーニングできるタンパク質を発現する。

【００７６】

HSC細胞を治療遺伝子により形質導入してもよい。例えば、形質導入はretroウイルスベクター（例えば、WO 94/29438、WO 97/21824およびWO 97/21825に記載された）またはpoxウイルスベクターなどのウイルスベクターを介してもよい。形質導入がex vivoである場合、形質導入した細胞を次いでレシピエントに投与する。従って、本発明は、遺伝子を本明細書に開示した方法によりex vivoまたはin vitroで投与することによる、HSC中への遺伝子導入に受入れられる疾患の治療を包含する。例えば、限定されるものでないが、β-地中海貧血症、鎌形赤血球貧血、アデノシンデアミナーゼ欠乏、リコンビナーゼ欠乏、およびリコンビナーゼ調節性遺伝子欠乏などを含む疾患を、治療遺伝子の導入によって直すことができる。遺伝子治療の他の効能は、薬剤耐性遺伝子を導入して正常な幹細胞が化学療法中に利点を有しかつ選択圧力を受けることができるようにすることである。好適な薬剤耐性遺伝子には、限定されるものでないが、多剤耐性耐性（MDR）タンパク質をコードする遺伝子が含まれる。

【００７７】

造血細胞に関連するものでない疾患も、遺伝的改変により治療することができ、その場合、前記疾患は、限定されるものでないが、ホルモン、酵素、インターフェロン、成長因子などを含む特別な分泌産物の欠落に関係する。適当な調節開始領域を使うことにより、正常にかかるタンパク質を産生する細胞型とは異なる細胞中であるものの、タンパク質の産生が自然生産に匹敵する欠乏タンパク質の誘導生産を達成することができる。また、特別な遺伝子産物または疾患、特に血液リンパ指向性疾患に対する感受性を抑制するリボザイム、アンチセンス または 他のメッセージを挿入することも可能である。

【００７８】

本明細書に使用される、治療遺伝子は、欠陥のある内因性遺伝子から生じる患者の欠乏を補償できる、全体の遺伝子または遺伝子の機能的に活性な断片だけであってもよい。治療遺伝子はまた、アンチセンス抑制に有用なアンチセンスオリゴヌクレオチドもしくは遺伝子、およびリボザイム介在性療法用のリボザイムも包含する。優性阻害オリゴヌクレオチドおよびペプチドをコードする遺伝子、ならびに制御タンパク質およびオリゴヌクレオチドをコードする遺伝子も本発明に包含される。一般的に、遺伝子治療は単一の治療遺伝子の導入に関わるが、特別な疾患の治療には、１以上の遺伝子が必要でありうる。治療遺伝子は正常、すなわち野生型、欠陥遺伝子のコピーまたは機能性相同体であってもよい。別の実施形態において、治療遺伝子は野生型の優性阻害性突然変異体である。1ベクター当たり1以上の遺伝子を投与してもよいし、あるいは、１以上の遺伝子を複数の適合しうるベクターを用いて送達してもよい。遺伝的欠陥に応じて、治療遺伝子は制御性および非翻訳配列を含んでもよい。ヒト患者の遺伝子治療用の治療遺伝子は一般的にヒト起源であるが、もしその遺伝子産物がレシピエントにおいて有害な免疫反応を誘発しなければ、高い相同性および生物学的に同一または同等の機能をヒトにおいて示す他の密接に関係する種由来の遺伝子を用いることができる。例えば、その遺伝子産物がヒトにおいてグルコースをグリコーゲンに変換できる霊長類インスリン遺伝子は、ヒト遺伝子と機能的に同等であると考えられる。治療用に好適である治療遺伝子は疾患によって変わりうる。例えば、

鎌形細胞細胞を治療するために好適な治療遺伝子はグロビン遺伝子の正常なコピーである。SCIDを治療するために好適な治療遺伝子は正常なADA遺伝子である。

【００７９】

一般的考察

本明細書に記載の実施形態のそれぞれに対して、本発明の範囲から逸脱することなしに、いくつもの変法を以下に記載の通り作りうる。

【００８０】

数値および範囲の文脈における用語「約」は、本発明を意図するように実施しうる、例えば、本明細書に含まれる教示から明らかである幹細胞活性の所望の速度、量、度または程度を有する、引用された値または範囲に近いまたは近接する値または範囲を意味する。従って、この用語は単純にシステム誤差から生じる値を超える値を包含する。

【００８１】

アンギオポエチン様タンパク質（Angptl）は、構造がアンギオポエチンに類似する分泌されるグリコシル化タンパク質のファミリーのいずれのメンバーであってもよい（Oikeら, Int. J. Hematol. 80：21-8 (2004)）。アンギオポエチンと同じように、アンギオポエチン様タンパク質はN-末端コイルドコイルドメインおよびC-末端フィブリノーゲン-様ドメインを含有する。アンギオポエチンと異なり、アンギオポエチン様タンパク質はチロシンキナーゼ受容体Tie2と結合しない。アンギオポエチン様タンパク質はアンギオポエチン様タンパク質2、3、4、5、6、および7を含む。アンギオポエチン様タンパク質はまた、ミクロフィブリル関連糖タンパク質4（Mfap4）、およびその類似体および同等体も含む。Angptl2は、Kim, I. ら J Biol Chem 274, 26523-8 (1999)により記載されている。さらに、アンギオポエチン様タンパク質は市販されている（R&D Systems、Abnova Corp）。アンギオポエチン様タンパク質2、3、4、5、7、およびMfap4が好ましい。

【００８２】

例示のアンギオポエチン様タンパク質は、例えばGenBankにおいて、受託番号AAH12368（ヒトAngptl2前駆体；配列番号3）受託番号AAH58287（ヒトAngptl3前駆体；配列番号4）受託番号AAH23647（ヒトAngptl4；配列番号5）および受託番号AAH49170（ヒトAngptl5；配列番号6）として提供される。配列番号3～6を図15に示す。他の好適なアンギオポエチン様タンパク質は、配列番号4～6のいずれかと少なくとも60％配列相同性を共有する。他の実施形態において、好適なアンギオポエチン様タンパク質は配列番号4～6と少なくとも70％または少なくとも80％または少なくとも90％配列相同性を共有する。Angptl7の例示の配列はGenBank受託番号AAH01881に見出される。Mfap4の例示の配列はGenBank受託番号NP_002395に見出される。上記のGenBank受託番号を有するAngptlタンパク質の例示の配列は本明細書に参照により組み入れられる。天然のAngptl配列に加えて、当業者はさらに、好適なアンギオポエチン様タンパク質は天然アミノ酸配列に変化を有するものの、その改変されたAngptl配列はAngptlタンパク質の機能を保持するタンパク質を含むことを理解するであろう。好適な改変は、非必須アミノ酸残基の変化または除去ならびに保存的なアミノ酸変化（例えば、アミノ酸残基を類似の側鎖を有するアミノ酸残基と置換すること）を含む。

【００８３】

アンギオポエチン様タンパク質の好適な同等体には、野生型または精製アンギオポエチン様タンパク質と類似の生物学的活性を有するタンパク質およびポリペプチド（例えば、遺伝子組換えにより作製された）が含まれる。アンギオポエチン様タンパク質の好適な類似体には、所望の活性および関係分子を保持する断片が含まれる。1つの好ましい類似体はコイルドコイル ドメインを含有するアンギオポエチン様タンパク質の断片である。例えば、アンギオポエチン様タンパク質2のコイルドコイルドメインである。本明細書に示したように、コイルドコイルドメインはHSC拡大を刺激する。他の類似体はフィブリノーゲン-様ドメインである。コイルドコイルドメインおよびフィブリノーゲン-様ドメインなどのAngptlの断片は、全長タンパク質と比較して、発現および精製することが容易でありうる。対応するアンギオポエチン様タンパク質受容体と結合し、そしてその受容体と結合

するアンギオポエチン様タンパク質に関連する１以上の生物学的作用を開始できる分子も本発明の範囲に含まれる。

【００８４】

アンギオポエチン様タンパク質は天然に産生されるものであってもよいしまたは好適な宿主においていずれかの好適な発現方法を用いてアンギオポエチン様タンパク質をコードする遺伝子を発現することにより産生させてもよい。宿主は、例えば細菌、酵母、または細胞培養物であってもよい。細胞培養物は、例えば、昆虫細胞培養物、または哺乳動物細胞培養物であってもよい。アンギオポエチン様タンパク質はグリコシル化されていてもよい。他の実施形態において、アンギオポエチン様タンパク質は、天然のアンギオポエチン様タンパク質と同じかまたは実質的に同じ方式でグリコシル化されている。

【００８５】

本明細書に記載した通り、造血幹細胞は赤血球、リンパ球および骨髄球を含む白血球を含む、いくつもの型の血液細胞に分化することができる。本明細書に記載した通り、HSCはin vivoで長期移植能を有する造血細胞を含む。長期移植能（例えば、長期造血幹細胞）は動物モデルまたはin vitroモデルを用いて決定することができる。

【００８６】

候補ヒト造血幹細胞集団の長期移植能に対する動物モデルとしては、非肥満糖尿病/重症複合免疫不全マウス（NOD/SCID）モデル、SCID-hu骨モデル（Kyoizumiら，(1992) Blood 79：1704；Murray ら，(1995) Blood 85(2) 368-378）およびin uteroヒツジモデル（Zanjaniら，(1992) J. Clin. Invest. 89：1179）が挙げられる。ヒト造血の動物モデルの総括については、Srourら，(1992) J. Hematother. 1：143-153およびそれに引用された参考文献を参照されたい。幹細胞に対するin vitroモデルは、間質共培養中で5～8週間後に産生されるいくつものクローン原性細胞の限定希釈分析に基づく長期培養開始細胞（LTCIC）アッセイである（Sutherlandら，(1990) Proc. Nat'l Acad. Sci. 87：3584-3588）。LTCICアッセイは、他の通常利用される、幹細胞アッセイ、コブルストーン領域形成細胞（cobblestone area forming cell）（CAFC）アッセイと、およびin vivo長期移植能と相関のあることが示されている（Breems ら (1994) Leukemia 8：1095）。

【００８７】

本明細書に使用される、拡大または増殖は、いずれかの細胞数の増加を含む。拡大は、例えば、培養を開始するために用いられた細胞集団中に存在するHSCの数を超える造血幹細胞の数の増加を含む。拡大はまた、造血幹細胞などの現存細胞の生存の増加も含む。用語、生存は、生存または機能を保持し続ける能力を意味する。

【００８８】

細胞培養を接種するために用いられる細胞は、成人および胎児両方の骨髄、サイトカインまたは化学療法動員末梢血、胎児肝、骨髄または臍帯血を含むいずれの供給源由来であってもよい。細胞の単離された画分を用いてもよい。例えば、骨髄または他の供給源から得た精製された「サイドポピュレーション」（SP）細胞を用いてもよい。他の濃縮されたHSCの集団を用いてもよい。HSCの濃縮された集団を単離する方法は当業者に公知であり、例えば、SP細胞を得る方法は、に記載されている（Goodellら，J. Exp. Med. 183，1797-806 (Apr. 1，1996)）。

【００８９】

細胞集団からの幹細胞の分離は、細胞ソーター（例えば、蛍光活性化細胞ソーター）磁性ビーズ、および充填カラムを含む、いくつもの方法により実施できる。高度に濃縮した幹細胞集団の例は、米国特許第5,061,620号に記載の$CD34^{+}Thy^{-}1^{+}LIN^{-}$表現型を有する集団である。この表現型の集団は、典型的には、ほぼ1/20の平均CAFC頻度を有する（Murray ら (1995)，前掲；Lansdorp ら，J. Exp. Med. 177:1331 (1993)）。当業者であれば、いずれの幹細胞集団で与えられる濃縮も、使われた選択判定基準ならびに所与の選択技法により達成される純度の両方に依存しうることを理解するであろう。造血幹細胞の高度濃縮された集団を単離する方法はさらに、米国特許出願第5,681,559号に記載されている。細胞の集団はいずれの好適な動物由来であってもよい。細胞は哺乳動物由来であってもよい

。好適な哺乳動物としては、ヒト、非ヒト霊長類、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、マウスなどが挙げられる。ある実施形態においては、細胞はヒト細胞であり、さらに他の実施形態においては、細胞はマウス細胞である。

【００９０】

本発明の方法を用いて、アンギオポエチン様タンパク質の存在のもとで拡大するいずれの幹細胞の拡大を刺激してもよく、これらの幹細胞には、他の型の成人幹細胞、例えば内皮前駆細胞（Shi, Q.ら （1998）, Blood. 92、362-367）、骨髄間質幹細胞（Owen, M.（1988）, J. Cell Science Supp. 10、63-76）、間葉幹細胞（Pittenger, M.F.およびMarshak, D.R. (2001), Marshak、D.R.、Gardner、D.K.、および Gottlieb、D. 編, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 349-374）、および骨格筋幹細胞（Gussoni, E.ら, (1999), Nature. 401, 390-394）、胚幹細胞、その他が含まれる。他の実施形態において、幹細胞はHSCと同じ前駆体-血管芽細胞を共有すると思われる内皮前駆細胞である。

【００９１】

本明細書に使われる用語、サイトカインは、細胞に様々な効果を果たす、例えば、成長もしくは増殖を誘導するまたは細胞死を防止する多数の因子のいずれか１つを意味する。本発明の実施に併用しうるさらなるサイトカインの非限定の例には、インターロイキン-2（IL-2）、インターロイキン3（IL-3）、可溶IL-6受容体を含むインターロイキン6（IL-6）、インターロイキン12（IL-12）、G-CSF、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、インターロイキン1α（IL-1α）、インターロイキン11（IL-11）、MIP-1α、白血病抑制因子（LIF）、およびflt3リガンドが含まれる。本発明はまた、１以上のサイトカインが培地から特異的に除外された培養条件も含む。サイトカインは、例えば、Amgen（Thousand Oaks、Calif.）、R & D Systems（Minneapolis、MN）およびImmunex（Seattle、Wash.）などのいくつかの販売業者から市販されている。

【００９２】

本発明の方法における造血幹細胞の拡大を促進するために有用なサイトカインには、繊維芽細胞成長因子（FGF）（例えばFGF-1またはFGF-2）、インスリン成長因子（例えばIGF-2、またはIGF-1）トロンボポエチン（TPO）、および幹細胞因子（SCF）が含まれる。従って、他の実施形態においては、培地はFGF、IGF、TPOおよびSCFまたはそれらの類似体および同等体の少なくとも２つを含む。それらの同等体には、野生型または精製されたサイトカイン（例えば、遺伝子組換えで作製された）として、これらの因子（すなわちFGF、TPO、IGFおよびSCF）と類似した生物学的活性を有する分子が含まれる。類似体には、所望の活性を保持する断片および関係分子が含まれる。例えば、TPOはmpl受容体のリガンドであり、従って、mpl受容体と結合しかつmplとのTPO結合に関連する１以上の生物学的作用を開始することができる分子も本発明の範囲内にある。TPOミメチックの一例がCwirlaら, Science 276：1696 (1997)に記載されている。

【００９３】

培養は、好適なin vitroの培地で細胞を培養することを含む。培養で増殖した細胞の子孫は親細胞と完全に（形態学的に、遺伝的に、または表現型的に）同一であり得ないことは分かっている。HSCを培養するために利用できる好適な培地は当業者には公知である。培地の実例としては、様々な異なる栄養分、ヘパリン、抗生物質、成長因子、サイトカインなどを補充してもよいHEPES、DulbeccoのMEM、IMDM RPMI-1640、およびStemSpan（Stem Cell Technologies）が挙げられる。好適な条件としては、33～39℃、そして 好ましくは37℃における培養を含む。HSCを培養する上での酸素濃度の影響は当技術分野で公知であり、例えば、Cipolleschiら, (1993), Blood 82：2031-7を参照されたい。HSCを1～10％の酸素濃度で培養してもよい。他の実施形態においては、酸素濃度は1～5％、例えば、酸素1％である。他の実施形態においては、HSCを低酸素条件下で培養する。培地を培養期間を通じて置き換えてもよい。他の実施形態においては、培地の半分を毎週2回、新しい培地と置き換える。細胞を3～30日間培養してもよい。他の実施形態においては、HSCを含む細胞の集団を少なくとも4週間培養する。他の実施形態においては、HSCを含む細胞の集

団を2週間まで培養する。他の実施形態においては、HSCを含む細胞の集団を7～14日間培養する。他の実施形態においては、HSCを含む細胞の集団を10日間培養する。

【００９４】

有効量は有利なまたは所望の結果を達成するのに十分な量である。有効量を1以上の投与回数で投与してもよい。本発明の目的のために、本明細書で使用されるアンギオポエチン様タンパク質および／またはサイトカインの有効量は、造血幹細胞の拡大を促進するのに十分な量である。他の実施形態においては、様々なサイトカインの有効量は個別に約0.1ng/mL～約500ng/mLであってもよい。他の実施形態においては、約1ng/mL～約200ng/mLを用いてもよい。他の実施形態においては、約10ng/ml～100ng/mlのサイトカインを用いてもよい。

【００９５】

単離されたまたは精製された細胞の集団は、細胞および細胞が自然状態で付随している物質を実質的に含まない。例えば、単離された造血幹細胞は、少なくとも50％の造血幹細胞、または少なくとも70％の造血幹細胞、または少なくとも80％の造血幹細胞の細胞集団を含む。さらに他の実施形態においては、単離されたまたは精製された造血幹細胞の集団は、少なくとも90％造血幹細胞を含むかまたは100％造血幹細胞である。実質的に間質細胞を含まない細胞集団は、本明細書に記載の培養系に置かれると、接着細胞層を形成しない。

【００９６】

被験者または個体は脊椎動物である。ある実施形態において、個体は哺乳動物である。哺乳動物には、限定されるものでないが、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ウシ、ウマ、イヌ、ネコなどが含まれる。ある好ましい実施形態において、哺乳動物はヒトである。

【００９７】

本発明の拡大された造血細胞を遺伝的に改変することができる。本明細書に使われる、遺伝的改変には、細胞のヌクレオチド配列に対するいずれかの付加、欠失または破壊が含まれる。本発明の方法は造血幹細胞中に遺伝子を導入するいずれかの方法であって、限定されるものでないが、ウイルスが介在する遺伝子導入、リポソームが介在する導入、形質転換、トランスフェクションおよび形質導入（例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスおよびヘルペスウイルスなどのDNAウイルス系ベクター、ならびにレトロウイルス系ベクターの使用などのウイルスが介在する遺伝子導入）を含む前記方法を包含することを意図する。ベクターの他の非限定の例としては、DNA/リポソーム複合体および標的化ウイルスタンパク質DNA複合体などの非ウイルスベクターが挙げられる。細胞への非ウイルスベクターの送達を増強するために、核酸またはタンパク質を抗体とコンジュゲートするかまたは、細胞表面抗原、例えば、Sca-1^+、IGF2-hFC^+、および$CD31^+$と結合するそれらの結合断片と結合させてもよい。新しく単離されたHSCを用いる場合、さらなる好適な表面マーカーとしては$endoglin^+$および$CD150^+$が挙げられる。標的化抗体またはその断片も含むリポソームを本発明の方法に用いてもよい。

【００９８】

本明細書に記載の通り、用語、トランスジーン、非相同性遺伝子、外因性遺伝物質、外因性遺伝子、および遺伝子をコードするヌクレオチド配列は、互換的に使われ、そして造血幹細胞中に導入されるゲノムDNA、cDNA、合成DNAおよびRNA、mRNAおよびアンチセンスDNAおよびRNAを意味する。外因性遺伝物質は異種であってもまたは個体または動物中に通常見出される遺伝物質のさらなるコピーであってもよい。細胞をヒトの疾患、症状または障害を治療する方法における医薬組成物の一成分として用いる場合、細胞を形質転換するために用いる外因性遺伝物質はまた、個体を治療するためにおよび／または細胞をさらに移植に受入れられるために用いる治療として選択されたタンパク質をコードしてもよい。

【００９９】

ウイルスベクターは、in vivo、ex vivoまたはin vitroで宿主細胞中に送達されるポリヌクレオチドを含む、遺伝子組換えで作製されたウイルスまたはウイルス粒子として定義される。ウイルスベクターの例としては、レンチウイルスベクターのようなレトロウイル

スベクター；アデノウイルスベクター；アデノ随伴ウイルスベクターなどが挙げられる。遺伝子導入にレトロウイルスベクターが介在する態様においては、ベクター 構築物はレトロウイルスのゲノムまたはその部分および治療遺伝子を含むポリヌクレオチドを意味する。

【０１００】

次の実施例はいずれの方法によっても本発明を限定することを意図するものでない。

【実施例】

【０１０１】

材料と方法

動物

C57 BL/6 CD45.2およびCD45.1マウスをJackson LaboratoryまたはNational Cancer Instituteから購入し、そしてWhitehead Institute animal facilityにおいて飼育した。全ての動物実験は、M.I.T. Committee on Animal Careの認可を得て実施した。

【０１０２】

FACSソーティング

ドナー骨髄球を8～10週齢C57BL/6 CD45.2マウスから単離した。SP Sca-1$^+$ CD45$^+$細胞をソートするために、成人マウス骨髄SP細胞（Zhang、C.C. & Lodish、H.F. Blood 103、2513-21 （2004）およびZhang、C.C. & Lodish、H.F. Blood 105、4314-20 （2005）に先に記載したように染色された）をさらに、抗-Sca-1-PEおよび抗-CD45-FITCを用いて染色し、その後、MoFlo(登録商標)ソーター上でソートした。

【０１０３】

Angptl2と結合するまたは結合しない細胞をソートするために、1x10^{6}骨髄球を、ウェスタンブロットにより測定してほぼ1μg/ml FLAG-Angptl2またはFLAG-hFc-Angptl2を含有する1ml順化培地に4℃で30分間再懸濁し、続いてAPC-抗-FLAG M2または抗-hFc IgG1-PE抗体を用いてそれぞれ染色した。模擬トランスフェクトした細胞からの順化培地を対照として用いた。

【０１０４】

DNAアレイ実験と分析

全RNAとcRNAを調製して、製造業者の取扱説明書に従って、Affymetrix U74Bv2およびU74Cv2マウスチップとハイブリダイズさせた。概説すると、全RNAをTRIzolを用いて単離した。15μgの全RNAを第1鎖および第2鎖cDNA合成用に用いて、次いでAmbion T7 MegaScriptキットを用いてin vitro転写を行い、ビオチン化cRNAを作製した。次いで、断片化cRNAをAffymetrix U74Bv2およびU74Cv2マウスチップと45℃にて16時間ハイブリダイズさせた。アレイを洗浄し、染色し、そして走査した。マイクロアレイデータをMicroarray Suiteにより分析した。胎児肝CD3$^+$細胞サンプルのアレイ中に検出されなかったバックグラウンドエレメント（Microarray Suite分析によって、ミスマッチ対照シグナル強度と有意差のない完全マッチハイブリダイゼーションとして定義した）をフィルターアウト（filter out）した。倍数変化の計算を容易にするために、任意の生の値（raw value）の50を、脾臓CD3$^+$または胎児肝Gr-1$^+$細胞サンプルのアレイにおいて発現レベル不検出であるかまたは走査読み出しが50未満である遺伝子に割り当てた。次いで全てのサンプルに対するアレイ測定値を、対照細胞から調製したcRNAとハイブリダイズしたアレイを用いて、全遺伝子のハイブリダイゼーションシグナルのメジアンを用いることにより規準化（normalize）した。規準化値＞2.0を有する胎児肝CD3$^+$細胞中の転写物を選択した。各候補転写物について、そのrefseqヌクレオチドIDをAffymetrix data centerから検索し、その後、Refseqタンパク質配列ID中に送った（transfer）。次いでタンパク質配列を、NCBI Entrez データベースからのバッチentrezを用いて得た。シグナルペプチドを、SignalPウエブサーバー（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）を利用して、Neural networksおよび Hidden Markovモデルの両方に基づいて予想した（Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. & von Heijne, G. Protein Eng 10, 1-6 (1997)、およびBendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G. & Brunak, S. J Mol Biol 340, 783-95 (2004)）。成人CD3$^+$および胎児肝

Gr-1$^+$細胞のレベルより2倍以上大きいレベルで胎児肝CD3$^+$細胞に発現されるシグナルペプチドをもつ候補タンパク質を選択して、さらなる研究を行った。

【０１０５】

Angptl2のコイルドコイルドメインおよびフィブリノーゲン-様ドメインの産生

c末端でFLAGペプチド配列と融合したヒトAngptl2をコードするDNAを、Flag-Angptl2として構築した。ヒトIgG1Fc配列のヒトAngptl2とPro100-Lys330を、IEGRMDリンカーペプチド（配列番号1）をコードするDNA配列により連結してAngptl2-hFcを形成した。全断片をpcDNA3.1のCMVプロモーターの下流に挿入した。そのプラスミドを、lipofectamine 2000（Invitrogen）を用いて293T細胞中にトランスフェクトし、トランスフェクション後48時間に順化培地を採集した。ウェスタンブロットにより測定して約1μg/mlのIGF-2-hFcを伴う順化培地を次の骨髄球の染色に用いた。

【０１０６】

FLAG-hAngptl2を構築するのと同じ様に、ヒトAngptl2断片のコイルドコイルドメインまたはフィブリノーゲン-様ドメインをコードするcDNAを作製した。前者はhAngptl2アミノ酸Arg1-Lys249を、後者はArg276-His493と融合したArg1-Pro76を含有した。両方ともC端末でFLAGエピトープと融合した。FLAG標識したヒトFgl1またはヒトMfap4も、コードされたタンパク質のC端末に融合したFLAGを用いて構築した。これらのプラスミドを293T細胞中にトランスフェクトし、そしてFLAG-Angptl2を作製する手順と同じ様に、順化培地を採集した。

【０１０７】

ウェスタンブロット

順化培地中の精製タンパク質または粗タンパク質を、4～12% NuPage Bis-Tris ポリアクリルアミドゲル（Invitrogen）上の電気泳動により分析し、タンパク質をニトロセルロースメンブラン上にエレクトロブロットした。メンブランを、西洋わさびペルオキシダーゼ-コンジュゲートした抗-FLAG M2モノクローナル抗体（Sigma；1：5000希釈で）またはヒトAngptl2特異的一次モノクローナル抗体（図1において：1μg/mlのクローン239829；図15Aにおいて：1μg/mlの239809.11、239813.111、239816.111、239819.111、239829.111、239830.11、239833.11、239834.11、および239835.111、全てR&D Systemsよりの寄贈）の組合わせを用いて探索し、西洋わさびペルオキシダーゼ-コンジュゲートしたヤギ-抗-マウス抗体（1：2000にて希釈）を用いてインキュベートし、そしてECLキット（Amersham、Arlington Heights、IL）による化学発光により検出した。

【０１０８】

リアルタイムPCR

全RNAを、示した胎児肝または骨髄球集団から単離した。第1鎖cDNAを、SuperScript II RT（Invitrogen）を用いて合成した。サンプルを、３重にSyBR Green PCRマスターミックスに提供された標準プロトコルおよびApplied Biosystemsより提供されたRT-PCRプロトコルに適合させた25μl反応液（プライマー300nM、マスターミックス12.5μl）で分析した。プライマーはQiagen（Angptl2用にQT00151179、およびAngptl3用にQT00110824）から購入した。デフォルトPCRプロトコルをApplied Biosystems Prism 7000配列検出系で用いた。各集団中のAngptl2およびAngptl3のmRNAレベルを、同じサンプル中に存在する18S RNA転写物のレベルに対して規準化した。

【０１０９】

アンギオポエチン様タンパク質

FLAG-hAngptl2、hAngptl2のコイルドコイルドメイン、hAngptl2のFLAG-標識したフィブリノーゲン-様ドメイン、FLAG-hAngptl4、FLAG-hFgl1、およびFLAG-hMfap4を、293T細胞の一過性トランスフェクションによりLipofectamine2000（Invitrogen）を用いて作製した。トランスフェクション後、細胞を一晩10%FBSを含むIMDM中で培養し、次いでIMDMを用いて洗浄し、その後に、無血清StemSpan培地（StemCellTechnology）中でさらに24時間培養した。順化培地を収穫し、図1、2、および5bの実験に用いた。模擬トランスフェクトした細胞からの培地を常にネガティブ対照として利用した。精製Angptl2またはAngptl3を

加える前に無血清順化培地で4時間培養した模擬トランスフェクトした293T細胞を、図3の実験に用いた。FLAG-Angptl2およびFLAG-Angptl4を精製するために、対応するプラスミドでトランスフェクトした293T細胞を、10％FBSを含むIMDM中で48時間または72時間培養し、そして順化培地を採集して抗-FLAGアフィニティ精製を行った。

【０１１０】

精製したマウスアンギオポエチン様タンパク質3（mAngptl3）はsf21細胞でバキュロウイルス発現系（R&D Systemsから寄贈された）を用いて産生した。GST-hAngptl5、GSTとヒトアンギオポエチン様タンパク質5（hAngptl5）の融合タンパク質は無細胞コムギ胚によりin vitro 転写／翻訳系（Abnova Corporation、Taiwanから購入した）で作製した。細菌に発現されたhAngptl2およびhAngptl7はR&D Systemsから寄贈されたものである。

【０１１１】

標識したAngptl2およびその他のFLAG標識したタンパク質の産生

ヒトAngptl2をコードするDNA（Kim, I.ら, J Biol Chem 274, 26523-8 (1999)）をC端末で、FLAGペプチド配列と融合したもの（FLAG-hAngptl2と呼ぶ）またはヒトIgG1Fc配列のPro100-Lys330と融合した後にFLAGと融合したもの（FLAG-hFc-hAngptl2と呼ぶ）を構築した。そのDNAをpcDNA3.1(-)ベクター（Invitrogen）のCMVプロモーターの下流に挿入した。プラスミドを293T細胞中にlipofectamine 2000（Invitrogen）を用いてトランスフェクトし、そしてトランスフェクション後48時間と72時間に、血清を含有する順化培地を採集した。

【０１１２】

FLAG-Angptl2およびFLAG-Angptl4の精製

無血清順化培地を以上に詳述したように48～72時間後にFLAG-hAngptl2またはFLAG-hAngptl4をトランスフェクトした293T細胞から収穫した。一錠／Complete Protease Inhibitor Cocktail（Roche）50ml、PMSF 5μg/ml、およびNaCl 100mMを加え、その培地を、順化培地500ml当たり樹脂500μlを用いて、抗-FLAGエピトープ・イムノアフィニティカラム（抗-FLAG M2アフィニティゲル、Sigma）に適用した。カラムを次いで、全100体積のTBS（50mM Tris、pH 7.4、150mM NaCl）により10倍洗浄し、そしてFLAG-hAngptl2またはFLAG-hAngptl4を、TBS中に溶解した0.1mg/ml FLAGペプチド（N-DYKDDDDK-C； 配列番号2）を用いて溶出した。

【０１１３】

細胞培養

6～9または8～10週齢C57BL/6 CD45.2マウスから単離した20のBM SP Sca-1$^+$ CD45$^+$細胞を、10μg/mlヘパリン（Sigma）、10ng/mlマウスSCF、20ng/mlマウスTPO、20ng/mlマウスIGF-2（全てR&D Systemsより）、および10ng/mlヒトFGF-1（Invitrogen）を補充しかつ示した量のアンギオポエチン様タンパク質を含むかまたは含まないStemSpan無血清培地（StemCell Technologies）100または160μl中にプレーティングした。いくつかの実験においては、細胞をU-ボトム-96-ウエルプレート（3799；Corning）の１つのウエル中にプレーティングした。個々の実験で示しかつ以上に詳述したように、これらのタンパク質のいくつかは精製済みであって、その他はトランスフェクトした293T細胞の順化培地から加えた。模擬トランスフェクトした細胞からの培地を常にネガティブ対照として用いた。示した培養の3～10日後に、細胞を競合移植のために収穫した。10μg/mlヘパリン、10ng/mlマウスSCF、20ng/mlマウスTPO、20ng/mlマウスIGF-2、および10ng/mlヒトFGF-1を補充した非順化無血清培地を、非順化STIF培地と名付け、そして293T細胞から採集し次いで上記サイトカインを補充した順化培地を順化STIF培地と名付けた。競合移植のために、少なくとも6つの培養ウエルからの細胞をプールし、そして競合細胞と混合した後に、示した数の細胞を各マウスに移植した。

【０１１４】

競合再構成分析

示した数のCD45.2ドナー細胞を1x10^{5}または2x10^{5}の新しく単離したCD45.1競合体骨髄球と混合し、その混合物を静脈内にレトロオービタル経路を介して、10Gyの全線量を予め照

射した6～9週齢CD45.1マウスのグループのそれぞれに注入した。移植したマウスの再構成を測定するために、末梢血を、示した移植後の時間に採集し、そしてリンパおよび骨髄コンパートメント中のCD45.1$^+$およびCD45.2$^+$細胞の存在を、記載されたように測定した（Zhang, C.C. & Lodish, H.F. Blood 103, 2513-21 (2004)、およびZhang, C.C. & Lodish, H.F. Blood 105, 4314-20 (2005)）。概要を説明すると、末梢血球をレトロオービタル出血により採集し、次いで赤血球を溶解し、そして抗-CD45.2-FITC、および抗-CD45.1-PE、または抗-Thy1.2-PE（T-リンパ系統に対して）、抗-B220-PE（B-リンパ系統に対して）、抗-Mac-1-PE、抗-Gr-1-PE（抗-Mac-1および抗-Gr-1を含有する細胞を骨髄系統とみなした）、または抗-Ter119-PE（赤血球系統に対して）モノクローナル抗体（BDPharmingen）を用いて染色した。図1cと1dを除く全ての図において示した「%再増殖（repopulation）」は抗-CD45.2-FITCおよび抗-CD45.1-PEの染色結果に基づく。全事例において、上掲の系統のFACS分析も実施して多系統再構成を確認した。限定希釈実験におけるCRUの計算はL-Calcソフトウエア（StemCell Technologies）を用いて実施した（Zhang, C.C. & Lodish, H.F. Blood 105, 4314-20 （2005））。

【０１１５】

一次ヒト細胞

一次ヒト臍帯血細胞はCambrex（Poietics^{TM}、ヒト臍帯血由来の単核球、Cat# 2C-150A）から購入した。細胞を、10^6細胞/［10μg/mlヘパリン（Sigma）、10ng/mlマウスSCF、20ng/mlマウスTPO、20ng/mlマウスIGF-2（全てR&D Systemsより）、および10ng/mlヒトFGF-1（Invitrogen）、ならびに100ng/ml Angptl3またはAngptl5を補充した］StemSpan無血清培地（StemCellTechnologies）mlの密度でプレーティングした。培地体積を、第5、8、12、および15日に新しい培地を加えることにより増加して細胞密度を$5x10^5$～$1.5x10^6$細胞/mlに維持した。

【０１１６】

NOD/SCIDマウス中への移植

ヒト臍帯血単核球から培養した子孫を示した日に採集し、そして亜致死的に照射した（350rad）NOD-SCIDマウス（Jacksonより購入）中に注入した。移植後2ヶ月に、移植した動物からの骨髄有核細胞を、フローサイトメトリーによりヒトCD45$^+$細胞の存在について分析した。マウス骨髄球のなかに少なくとも0.1%CD45$^+$ヒト細胞を検出したときにマウスはヒトHSC移植に対してポジティブであると考えた。

【０１１７】

結果

胎児肝CD3$^+$細胞はAngptl2およびAngptl3を発現する

E15マウス胎児肝CD3$^+$細胞に特異的に発現されるが、培養中のHSC維持もしくは拡大を支援しない２つの細胞集団（成人CD3$^+$細胞および胎児肝Gr-1$^+$細胞）に発現されない分泌性または膜タンパク質をマイクロアレイ分析により同定した（表1）。

【表１】

表1

名称	GI	NP	FLCD3$^+$（生）(1)	SpnCD3$^+$（生）(2)	FLGr-1$^+$（生）(3)	倍数 (1)/(2) (規準化)	倍数 (1)/(3) (規準化)
claudin 13	10048432	NP_065250	4184.2	26.6	10.7	96.5	96.5
RIKEN cDNA 4432416J03	21313426	NP_084345	1774.3	21.2	8.7	42.3	42.3
ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド7	12963823	NP_076274	936.2	18.7	8.0	20.7	20.7
アンギオポエチン様2	31560520	NP_036053	583.2	4.2	5.8	13.8	13.8
popeyeドメイン含有2	11612497	NP_071713	581.6	4.5	3.7	9.5	9.5
発現された配列C85492	31981988	NP_705768	470.0	3.2	3.8	9.3	9.3
RIKEN cDNA 2210020M01	34304038	NP_899082	375.1	7.5	3.3	8.0	8.0
QIL 1 タンパク質	23346595	NP_694792	281.5	2.2	2.2	5.8	5.8
RIKEN cDNA C730027E14	22122497	NP_666132	277.8	3.8	3.5	4.7	4.7
RIKEN cDNA 1300010M03	28077025	NP_083209	237.7	3.1	4.1	5.3	5.3
RIKEN cDNA 4931414P19	28077031	NP_083166	214.4	2.3	2.6	3.8	3.8
claudin 14	34328494	NP_062373	208.5	2.9	26.4	4.8	4.8
ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド24	9625035	NP_062523	201.1	1.9	37.1	3.2	3.2
RIKEN cDNA 1100001I19	27370416	NP_766508	182.0	2.6	2.9	4.3	4.3
アンギオポエチン様3	33469117	NP_038941	171.6	2.0	15.5	3.3	3.3
neuritin 1	23956286	NP_705757	60.2	1.8	3.9	3.0	3.0

【０１１８】

アンギオポエチン様2（Angptl2）とアンギオポエチン様3（Angptl3）の両方がこの幹細胞支援集団に特異的に発現される分泌タンパク質であることを見出した（表1、図11A）。これらのタンパク質はまた、SPCD45$^+$ Sca-1$^+$が高度に濃縮されたHSC集団を含む成人骨髄（BM）細胞において発現されることも見出した（図11Bおよび図11C）。これらの２つのタンパク質がHSC生物学に関係することは従来示唆されたことがない。

【０１１９】

新しく単離して4日間培養した骨髄HSCはAngptl2と結合する

Angptl2のヒトIgG Fcフラグメントまたは FLAGペプチドとの融合タンパク質を作製した

。これらの融合タンパク質を用いて、Angptl2と結合できるまたはできない新しく単離したまたは培養した骨髄球の集団を単離し、次いでそれらの再構成分析をすると、Angptl2は新しく単離したBM HSCの大部分（図12A）および全ての4日間培養したHSC（図12B）と結合できることを見出した。この結果は、Angptl2に対する受容体がほとんどの新しく単離されたHSCおよび全ての培養したHSCに発現されることを実証する。

【０１２０】

図12Aに示した実験において、新しく単離された成人CD45.2骨髄球を4℃にて30分間、対照をトランスフェクトした293T細胞またはAngptl2-hFc-発現ベクターによりトランスフェクトした細胞からの順化培地を用いてインキュベートした；後者の培地はほぼ1μg/ml Angptl2-hFcを含有した。次いで細胞を抗-ヒトIgG1-PEにより染色した。平均して12.8％の全骨髄球がAngptl2-hFcと結合し、そして4日間培養した骨髄球の5.3％がAngptl2と結合した。$5X10^4$のポジティブ染色した細胞および同じ数のネガティブ染色した細胞を$2X10^5$ CD45.1競合細胞と一緒に亜致死照射したCD45.1マウス（n=4～5）中に移植した。末梢血球を、移植後3週間および4ヶ月にリンパおよび骨髄コンパートメント中の$CD45.2^+$ 細胞の存在について分析した。

【０１２１】

図12Bに示した実験において、成人CD45.2骨髄球を、SCF、TPO、IGF-2、および FGF-1を含む無血清培地で記載の通り4日間培養した（Reya, T.ら, Nature 423, 409-14 (2003)）。次いでその細胞を、図3に記載のと同じように、Flag-Angptl2含有培地（ほぼ1μg/ml Flag-Angptl2）により染色した。全細胞の5.3％がアンギオポエチン-FLAGと結合した。1300のポジティブ染色した細胞および8000のネガティブ染色した細胞を、$2X10^5$ CD45.1競合体細胞と一緒に亜致死照射したCD45.1マウス（n=4）に移植した。移植後3週間および3ヶ月に、末梢血球をリンパおよび骨髄コンパートメント中の$CD45.2^+$細胞の存在について分析した。

【０１２２】

Angptl2およびAngptl3はex vivoでHSCの拡大を刺激する

真核生物の発現ベクターpcDNA3.1(-)中のC端末においてFLAGタグと融合したヒトAngptl2をコードする全配列（FLAG-Angptl2）を含有するプラスミドを構築した。293T細胞の一過性トランスフェクションの後、培養上清は、予想されるほぼ60kDサイズで移動する分泌されたFLAG-Angptl2を含有した（図1）。本明細書に記載の通り、新しく単離された大部分のLT-HSCと4日間培養した全てのLT-HSCはこのホルモンと結合した（図12）。

【０１２３】

図2に示した実験においては、20のCD45.2骨髄SP Sca-1^+ $CD45^+$細胞を96-ウエルU-ボトムプレートの各ウエル中の、模擬トランスフェクトした293T細胞から採集した無血清順化培地（S/F：無血清培地、SCF：10 ng/ml SCFを含む無血清培地、S+T：10ng/ml SCFおよび20ng/ml TPOを含む無血清培地、S+T+I+F：10ng/ml SCF、20ng/ml TPO、20ng/ml IGF-2、および10ng/ml FGF-1を含む無血清培地）に、またはFlag-Angptl2によりトランスフェクトした293T細胞からの無血清順化培地（S/F+Angptl2：ほぼ100ng/ml Angptl2を含む無血清培地、S+A：10ng/ml SCFおよびほぼ100ng/ml Angptl2を含む無血清培地、S+T+A：10ng/ml SCF、20ng/ml TPO、およびほぼ100ng/ml Angptl2を含む無血清培地、S+T+I+F+A：10ng/ml SCF、20ng/ml TPO、20ng/ml IGF-2、10ng/ml FGF-1、およびほぼ100ng/ml Angptl2を含む無血清培地）に播種した。示した図は培養の3日後に位相差顕微鏡下で撮影した。

【０１２４】

２つの独立した実験の代表例（図3A）は、Angptl2がLT-HSCのex vivo拡大の刺激因子であることを示す。この研究において、Angptl2は精製されてなかったが、FLAG-Angptl2発現ベクターによりトランスフェクトした293T細胞の順化培地中に含有されていた；そして模擬トランスフェクトした細胞からの順化培地がネガティブ対照の役割を果たした。20の成人BM SP $CD45^+$ Sca-1^+細胞、高度に濃縮されたHSC集団（Camargo, F.D., Green, R., Capetanaki, Y., Jackson, K.A. & Goodell, M.A. Nat Med 9, 1520-7 (2003)）を5日間、SCFを補充した無血清培地で培養すると、競合再構成により測定して実質的に全ての長期

（LT）-HSC活性が失われた（図3A、バー7および12をそれぞれバー6および11と比較されたい）。SCFおよび100ng/mlFLAG-Angptl2を含む同じ培地中の5日間培養後に、LT-HSC活性は著しく増加した（バー8および13をそれぞれバー7および12と比較されたい）。同様に、SCF、TPO、IGF-2、FGF-1およびAngptl2の存在のもとでの10日間培養したHSCは、Angptl2を含まない同じ培地中の培養と比較して、すさまじいLT-HSC活性の増加を達成した（バー10および15をそれぞれバー9および14と比較されたい）。Angptl2の存在のもとで培養した幹細胞は、移植後9ヶ月の一次レシピエントの（図3B）ならびに二次移植されたマウスにおいて（図3C）、リンパおよび骨髄系統の両方を再増殖し、LT-HSCの正味の拡大を示した。移植後9ヶ月に、全てのマウスは健康でありかつ腫瘍は観察されなかった。100 ng/ml FLAG-Angptl2の添加もまた、移植後3週に測定して、ST-HSC活性の拡大の増加を引き起こした（バー3を2と、5を4と比較されたい）。

【０１２５】

重要なこととして、高度に濃縮されたHSCを、SCF、TPO、IGF-2、およびFGF-1を含有する無血清培地において培養すると、LT-HSC数が8倍増加をもたらすことを見出した（Zhang, C.C. & Lodish, H.F. Blood 105, 4314-20 (2005)）。Angptl2を加えることによるHSC拡大の程度がさらに増加することを観察した。それ故に、Angptl2はその効果が他のHSC成長因子と相乗的である新規の成長因子である。

【０１２６】

純粋な組換えAngptl2を単離するために、FLAG-Angptl2をトランスフェクトした293T細胞から得た順化培地を採集し、そしてイムノアフィニティクロマトグラフィにより、FLAGエピトープに特異的な固定されたモノクローナル抗体を用いて、FLAG標識したタンパク質を精製した。溶出した画分のSDS-PAGEは２つの主ピークを示し、１つは全長FLAG-Angptl2（ほぼ60kDa）、そして他の１つはより小さいほぼ36kDaのペプチド（図4A、レーン3）であった。哺乳動物に発現された全長FLAG-Angptl2は、細菌に発現されたAngptl2より高い分子量を有し（レーン3をレーン2と比較されたい）、哺乳動物に発現されたAngptl2がグリコシル化されているという従来の結果と一致する（Kim、I.ら, J Biol Chem 274、26523-8 (1999)）。C-末端FLAGエピトープを再認識する抗-FLAGM2抗体によるウェスタンブロット（図4B）はAngptl2特異的モノクローナル抗体がそうであったように両方のバンドが染色された（図4C）。従って、FLAG-Angptl2は精製中に、部分的タンパク質分解を受けた。

【０１２７】

図5に示したように、精製された哺乳動物に発現されたAngptl2は造血幹細胞の増殖を刺激した。20のCD45.2骨髄SP Sca-1$^+$ CD45$^+$細胞を、10ng/ml SCF、20ng/ml TPO、20ng/ml IGF-2、および10ng/ml FGF-1を含む無血清培地で、または100ng/ml精製Flag-Angptl2を含む同じ培地で、10日間培養した（図4のように）。次いで、その細胞を1X10^5 CD45.1競合体とともにCD45.1レシピエント（n=5）中に同時移植した。移植後3週間（左パネル）および2ヶ月（右パネル）の移植を示した。

【０１２８】

図7の限定希釈競合再増殖アッセイは、他の成長因子とともにAngptl2またはAngptl3を含む精製HSCの培養は、LT-HSC数の20倍以上の拡大をもたらした。新しく単離したBM SP CD45$^+$ Sca-1$^+$ 細胞における長期再増殖細胞（CRU）の頻度は、移植後3ヶ月で23当たり1であり（平均に対する95％信頼区間：1/15～1/35、n=25；図7A、ボトムライン）または移植後6ヶ月で39中の1であった（平均に対する95％信頼区間：1/24～1/63；図7A、トップライン）。すなわち、Poisson統計学から計算されるように、平均で23または39の新しく単離されたBM SP CD45$^+$ Sca-1$^+$ 細胞の注入が、移植されたマウスの63％（=1-1/e）を再増殖するのに十分である。Angptl2を含む無血清順化STIF培地中で細胞を10日間培養した後に、細胞数は信頼できる計数をするには数が少な過ぎた。しかし、最初に培養に加えた細胞の数に基づくと、培養細胞のCRUは移植後3ヶ月で1/1.1（図7B、ボトムライン；平均に対する95％信頼区間： 1/0.5～1/2.3、n = 30）または移植後6ヶ月で1/1.6であった（図7B、トップライン；平均に対する95％信頼区間：1/1.1～1/2.3）。言い換えると、わずか1.

1または1.6の新しい単離されたBM SP CD45$^+$ Sca-1$^+$ 細胞の培養された子孫の注入がマウスの63％を再増殖するのに十分である。従って、図7Bのデータは、LT-HSC（移植後6ヶ月）の数が培養後に24倍（=39/1.6）増加することを示す。

【０１２９】

同じ方法を用いて、精製Angptl3の効果を測定した。培養細胞のCRUは、再び最初に培養に加えた細胞の数と比較して、移植後3ヶ月に1/0.7（図7C、ボトムライン；平均に対する95％信頼区間：1/0.3～1/1.7、n=24）または移植後６ヶ月に1/1.3（図７C、トップライン；平均に対する95％信頼区間：1/0.9～1/2.0、n = 24）であった。それ故に、精製Angptl3の存在のもとでの10日間のBM SP CD45$^+$ Sca-1$^+$細胞の培養は、LT-HSCの再増殖の30（=39/1.3）倍拡大をもたらす（移植後6ヶ月）。

【０１３０】

Angptl3によるHSC活性の拡大は、Angptl2によるのと同じように、高度に再現性があった。２つのさらなる実験において、20のBM SP CD45$^+$ Sca-1$^+$ 細胞の子孫は、100ng/ml Angptl3を含む無血清順化STIF培地中の10日間の培養後に、それぞれ移植後4ヶ月に65.3％±4.0％および73.1％±3.1％（n=5）の移植を示した。従って、この培養系は一致してHSCの再増殖活性のすさまじい増加を達成した。図6はAngptl2の哺乳動物細胞特異的翻訳後改変がex vivoでHSC拡大のその刺激を促進することを示す。図3Aの結果を立証し、100ng/ml哺乳動物に発現されたAngptl2の添加は培養後のHSC活性を有意に増加した（図6、それぞれバー3および8をバー1および6と比較されたい）。対照的に、100ng/mlの細菌に発現されたAngptl2は、STIF培地でのHSC拡大を単独で刺激できなかった（図6、それぞれバー2および7をバー1および6と比較されたい）。これは、いくつかの哺乳動物特異的改変、恐らくはグリコシル化（図4A、レーン2および3を参照されたい）がLT-HSC拡大を刺激するAngptl2の能力と正の相関を有することを示唆する。Angptl2のコイルドコイル ドメインもex vivoでHSC拡大を刺激した（図6の右パネル、それぞれバー4および9をバー1および6と比較されたい）。

【０１３１】

いくつかのAngptlファミリーメンバーはHSC拡大を刺激する

Angptl2およびAngptl3はアンギオポエチン様タンパク質のファミリーに属する（Oike, Y., Yasunaga, K. & Suda, T. Int J Hematol 80, 21-8 (2004)）。図5は、このファミリーのいくつかのメンバー（Angptl2およびAngptl3のような）が培養でHSC拡大を刺激できることを示す。HSCのex vivo拡大の刺激に対して、293T順化培地中の精製Angptl3、Angptl5、または Angptl7、ならびにAngptl2、Angptl4、またはミクロフィブリル関連糖タンパク質4（Mfap4）のコイルドコイルドメインの効果を試験した。全てのこれらの因子は培養後のHSC活性の増加を支援する。

【０１３２】

図8に示したように、293T細胞順化培地中に発現したAngptl2-コイルドコイルドメイン、Angpt14、およびMfap4は造血幹細胞の増殖を刺激した。20のCD45.2骨髄SP Sca-1$^+$ CD45$^+$細胞を、5 日間、10ng/ml SCF、20ng/ml TPO、20ng/ml IGF-2、10ng/ml FGF-1を含む無血清模擬トランスフェクトした順化培地中（レーン1および8）、同じ因子と全長Angptl2（レーン2および9）、Angptl2コイルドコイルドメイン（レーン3および10）、Angptl2フィブリノーゲン-様ドメイン（レーン4および11）、Angptl4（レーン5および12）、フィブリノーゲン-様1（レーン6および13）、またはミクロフィブリル関連糖タンパク質4（レーン7および14）を含む順化培地で培養した。次いで、細胞を1X10^5 CD45.1競合体とともにCD45.1レシピエント（n=5）中に同時移植した。移植後2週間（左パネル）および1ヶ月（右パネル）の移植を示した。

【０１３３】

FLAG-標識したAngptl4を293T細胞の一過性トランスフェクションにより作製し、次いで固定した抗-FLAGモノクローナル抗体を用いてイムノアフィニティ精製した。さらに、精製Angptl3（バキュロウイルス系を用いてsf21細胞で産生した）、GST-融合したAngptl5（無細胞コムギ胚invitro転写／翻訳系により産生した）、およびAngptl7（細菌発現系によ

り産生した）（左パネル、図10A）を得た。

【０１３４】

骨髄SPSca-1$^+$CD45$^+$細胞を5日間、無血清非順化STIF培地において、100ng/mlのAngptl3、Angptl4、Angptl5、または1μg/mlのAngptl7の存在のもとで培養した（図10A）。Angptl3の培養への添加は、ST-HSCおよびLT-HSCの両方の拡大を刺激した（図10A、バー2、7、および12をそれぞれバー1、6、および11と比較されたい）。ST-およびLT-HSC両方の活性の有意な増加も、Angptl5、およびまた1μg/mlの細菌に発現されたAngptl7による培養後に観察された（バー1、6、および11をそれぞれバー4、9、および14、ならびにバー5、10、および15と比較されたい）。Angptl4は、移植後2週間および1ヶ月に試験すると、少なくともいくらかのHSC活性を刺激した（図9）。しかし、100ng/ml Angptl4は、3ヶ月および6 ヶ月においてHSC拡大を刺激する効果はなかった （図10、バー3、8、および 13を比較されたい）。

【０１３５】

Angptlの２つのオルソログ、ミクロフィブリル関連糖タンパク質4（Mfap4）（Zhao, Z.ら Hum Mol Genet 4, 589-97 (1995)）およびフィブリノーゲン-様1（Fgl1）（Yamamoto, T.ら, Biochem Biophys Res Commun 193, 681-7 (1993)）の効果も試験した。両方の全長タンパク質をFLAG標識し、293T細胞の一過性トランスフェクションにより作製した。これらを培地に分泌させてウェスタンブロットにより検出した（図10B、左パネル）。ほぼ100ng/mlのFLAG-Mfap4およびFLAG-Fgl1の両方を、無血清順化STIF培地中でHSCに直接適用した（図10B）。競合再構成分析は、Mfap4が5日間培養後にBM SP Sca-1$^+$ CD45$^+$ LT-HSCのex vivo拡大を刺激する一方、Fgl1が刺激しない（図10B）ことを実証した。

【０１３６】

Angptl5はヒト臍帯血細胞においてHSC活性を刺激する

図13に実証した通り、Angptl5を補充したSTIF培地において一次ヒト臍帯血細胞を培養すると、SCIDマウス再増殖活性の頻度のほぼ3倍増加を生じた。

【０１３７】

結論として、アンギオポエチン様タンパク質は、ヒトHSCを含むHSCに対する重要な新規成長因子であることがわかった。アンギオポエチン様タンパク質によるHSCのex vivo拡大の刺激は、おそらくホルモンのこれらの細胞に対する直接効果から生じるのであろう。本明細書に記載した通り、新しく単離したLT-HSCの大部分および4日間培養した全てのLT-HSCはAngptl2と結合した；従って、Angptl2の未知の受容体が培養HSC上に発現される。さらに、本明細書に記載の培養は、160μlの培地中に高度に濃縮されたHSCを20しか含有しない。このように細胞密度が低いので、この集団中のいずれかのアクセサリー細胞がAngptl2に応答してHSC拡大を刺激するのに十分な他の成長因子を産生することは恐らくないであろう。

【０１３８】

飽和レベルのSCF、TPO、IGF-2、および FGF-1を用いる骨髄HSC用の単純な無血清培養系を開発した；高度に濃縮されたHSCの10日の培養中で、LT-HSCの数の8倍増加が観察された（Zhang, C.C. & Lodish, H.F. Blood 105, 4314-20 (2005)）。SCF、IGF-2、および FGF-1は全て受容体タンパク質-チロシンキナーゼを活性化する一方、TPOは、細胞内シグナル伝達経路を活性化するJanusキナーゼを必要とするサイトカイン受容体スーパーファミリーのメンバーを介してシグナルを送る。本明細書に実証した通り、Angptlファミリー（具体的にはAngptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、および Angptl7、ならびに Mfap4）のいくつかのメンバーのいずれかの添加は、HSC活性のさらなる増加をもたらす。このことは、SCF、TPO、IGF-2、またはFGF-1により活性化されるだけでなく、Angptlがシグナル伝達経路を活性化することを示唆する。本明細書に実証した通り、少なくともAngptl2およびAngptl3は、HSC支援マウス胎児肝CD3$^+$細胞により産生される；それ故に、Angptl2およびAngptl3の両方は通常in vivoで胎児肝およびまた恐らくは成人のHSCの拡大を刺激する機能を有しうる。図13に実証した通り、Angptl5はヒトHSCを刺激し、Angptl類もヒトHSCに対する重要な成長因子ファミリーであることを実証する。それ故に、Angptl類はHSCのex vi

vo拡大に有用である。さらに、これらの因子は、HSC移植または遺伝子治療プロトコルの一部として、これらの細胞のex vivo拡大に有用である。

【０１３９】

本明細書、具体的な実施例およびデータは、例示の実施形態を示すものの、説明の方法として与えられたものであり、本発明を限定することを意図しないことは理解されなければならない。本発明内の様々な変化と改変が、本明細書に含まれる考察、開示およびデータから当業者には明らかになりうるのであって、従って、本発明の部分であると考えられる。

【図面の簡単な説明】

【０１４０】

【図１】上パネルは、C端末でFLAGエピトープと融合したヒトAngptl2タンパク質を発現するプラスミドの模式図を示し、そして下パネルは、pcDNA3.1(-)（レーン1）またはFLAG-Angptl2をコードするpcDNA3.1(-)（lレーン2）によりトランスフェクトした293T細胞の48時間順化培地の、FLAGエピトープに対する抗体によって探索したウェスタンブロットを示す。

【図２】様々な培養条件において、Angptl2を用いてまたは用いないで、FACSソートした骨髄SP Sca-1$^+$ CD45$^+$細胞の顕微鏡写真を示す。

【図３Ａ】前培養しなかった（バー1、6、および11）または示したように培養した、1x10^5 CD45.1競合体と同時移植した20の新しく単離したCD45.2骨髄SP Sca-1$^+$ CD45$^+$細胞による移植後3週間、4ヶ月、および9ヶ月のバー％再増殖を示すバーグラフである。

【図３Ｂ】図3B上パネルは、移植後9ヶ月の移植片（図3Aのバー15からの細胞）における1マウスからの末梢血単核細胞の代表的FACSプロットを示し（各象限の数字は各象限の細胞の百分率である）；下パネルは、図3Aのバー13および15における全マウスからのデータのまとめを示す。

【図３Ｃ】図3C上パネルは、二次移植後4ヶ月の移植片における1マウスからの末梢血単核細胞の代表的FACSプロットを示し；下パネルは図3Aのバー8および10に表されたマウス骨髄の二次移植後4ヶ月における全マウスからのデータのまとめを示す。

【図４】図４Aは、SDS-PAGEにより分画した、大腸菌に発現された精製Angptl2の16ng（レーン2）、および哺乳動物に発現された精製FLAG-Angptl2タンパク質の2.5ng（抗-FLAGカラムから精製した、レーン3）の銀染色を示す。図４Bは、抗-FLAG抗体により探索した、精製Angptl2（右レーン）および対照（左レーン）のウェスタンブロットを示す。図４Cは、抗-Angptl2 mAbにより探索した、精製Angptl2（右レーン）および対照BSA（左レーン）のウェスタンブロットを示す。

【図５】精製Angptl2がHSCに対する成長因子であることを示すバーグラフである。

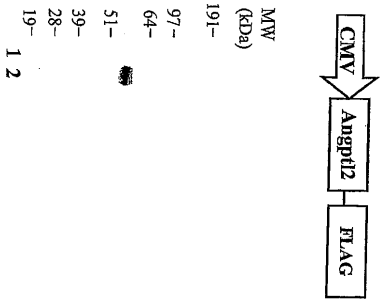
【図６】図6の左パネルは、hAngptl2に対する抗体を用いて探索した、pcDNA3.1(-)（レーン1）、FLAG-hAngptl2コイルドコイルドメイン（レーン2）、またはFLAG-hAngptl2フィブリノーゲン-様ドメイン（レーン3）によりトランスフェクトした293T細胞の48時間順化培地のウェスタンブロットを示し；右パネルは、無血清模擬トランスフェクトした293T細胞順化STIF培地中で（バー1および6）；大腸菌で発現した全長Angptl2の100ng/mlを含む同じ培地中で（バー2および7）；および哺乳動物で発現した全長Angptl2の100ng/mlを含む同じ培地中で（バー3および8）5日間培養した、20のCD45.2骨髄SP Sca-1$^+$ CD45$^+$細胞による移植後3ヶ月および6ヶ月の％再増殖を示すバーグラフである。

【図７】図7Aは、BM SP CD45$^+$Sca-1$^+$細胞の示した数を用いて再増殖したマウスの％を示すグラフである。図7Bは、100ng/mlの精製Angptl2を含有する無血清順化STIF培地中で10日間培養後のBM SP CD45$^+$Sca-1$^+$細胞の示した数を用いて再増殖したマウスの％を示すグラフである。図7Cは、100ng/mlの精製Angptl3を含有する無血清順化STIF培地中で10日間培養後のBM SP CD45$^+$Sca-1$^+$細胞の示した数を用いて再増殖したマウスの％を示すグラフである。

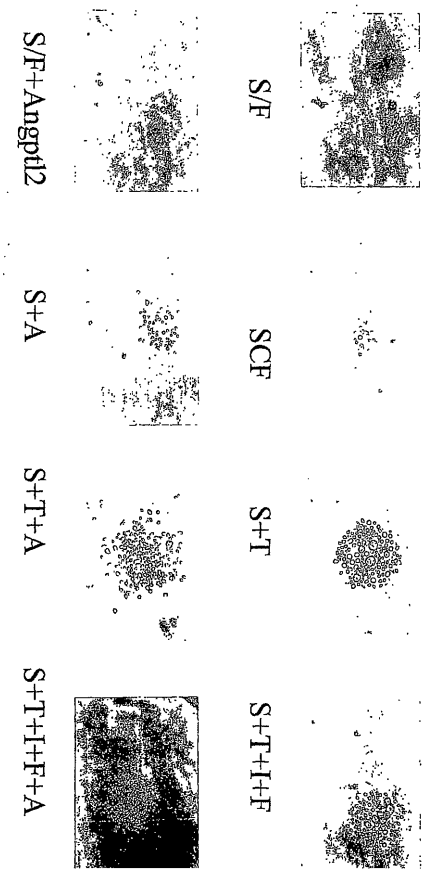
【図８】精製Angptl3、Angptl5、およびAngptl7が造血幹細胞に対する成長因子であることを示すバーグラフである。

【図９】293T細胞順化培地に発現したAngptl2-コイルドコイルドメイン、Angptl4、およびMfap4が造血幹細胞の増殖を刺激したことを示すバーグラフである。
【図１０Ａ】図10Aの左パネルは、SDS-PAGEにより分画した、細菌に発現した精製hAngptl7（レーン2）、コムギ胚in vitro転写した精製GST-hAngptl5（レーン3）、哺乳動物に発現した精製hAngptl4（レーン4）、およびsf21に発現した精製mAngptl3（レーン5）の銀染色を示し；右パネルは、5日間、無血清非順化STIF培地で培養した（バー1、6、および11）、または昆虫で発現した精製mAngptl3の100ng/mlを含む同じ培地で培養した（バー2、7、および12）、または精製hAngptl4の100ng/mlを含む同じ培地で培養した（バー3、8、および13）、または精製GST-hAngptl5の100ng/mlを含む同じ培地で培養した（バー4、9、および14）、または細菌で発現した精製hAngptl7の1μg/mlを含む同じ培地で培養した（バー5、10、および15）、20のCD45.2骨髄SP Sca-1^{+}CD45^{+}細胞による移植後4週間、3ヶ月、または6ヶ月の％増殖を示すバーグラフである。
【図１０Ｂ】図10Bの左パネルは、pcDNA3.1(-)（レーン1）、FLAG-hMfap4をコードするpcDNA3.1（レーン2）、またはFLAG-hFgl1をコードするpcDNA3.1（レーン3）によりトランスフェクトした293T細胞の48時間順化培地のウェスタンブロットを示し、これはFLAGエピトープに特異的な抗体により探索したものであり；右パネルは、5日間、無血清模擬トランスフェクトした順化STIF培地で（バー1および4）、FLAG-hFgl1をコードするpcDNA3.1によりトランスフェクトした293T細胞からの順化STIF培地（バー2および5）で、またはFLAG-hMfap4をコードするPCDNA3.1によりトランスフェクトした293T細胞からの順化STIF培地（バー3および6）で培養した、20のCD45.2骨髄SP Sca-1^{+} CD45^{+}細胞による移植後4週間、3ヶ月、または6ヶ月の％増殖のバーグラフを示す。
【図１１】図11Aは、示した表現型（FLは胎児肝である）を有する細胞におけるAngptl2（左パネル）またはAngptl3（右パネル）mRNAの平均相対発現を示すバーグラフである。図11Bは、示した表現型を有する成熟マウス骨髄造血細胞および成熟マウス骨髄球におけるAngptl2 mRNAの平均相対発現を示すバーグラフである。図11Cは、示した表現型を有する成熟マウス骨髄造血細胞および成熟マウス骨髄球におけるAngptl3 mRNAの平均相対発現を示すバーグラフである。
【図１２】図12Aは、新しく単離したた成熟CD45.2 BM細胞による移植後3週間または4ヶ月の％再増殖、および示したようにAngptl2と結合するかまたは結合しないかを示すバーグラフであり、新しく単離されたHSCがAngptl2と結合することを実証する。図12Bは、SCF、TPO、IGF-2、およびFGF-1を含む無血清培地で4日間培養した成熟CD45.2 BM細胞による移植後3週間または4ヶ月の％再増殖、および示したようにAngptl2と結合するかまたはしないかを示すバーグラフであり、4日間培養したHSCがAngptl2と結合することを実証する。
【図１３】示した成長因子を補充した培地中で示した日数だけ培養したヒト臍帯血細胞による移植後2ヶ月の、NOD/SCIDレシピエントマウスにおける％再増殖を示すグラフである。
【図１４】造血幹細胞の自己更新および異なる血液細胞型への分化の模式図である。
【図１５】例示のアンギオポエチン様タンパク質に対するアミノ酸配列を示す。

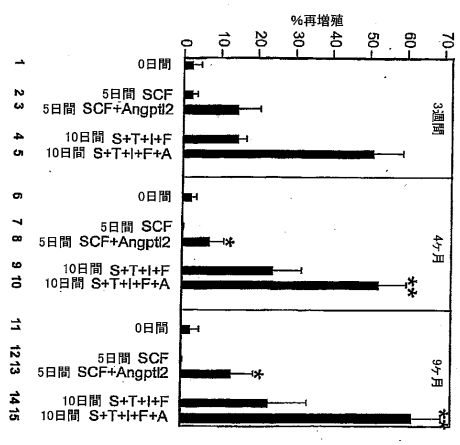
【図１】


CMV
Angptl2
FLAG
MW
(kDa)
191-
97-
64-
51-
39-
28-
19-
1 2

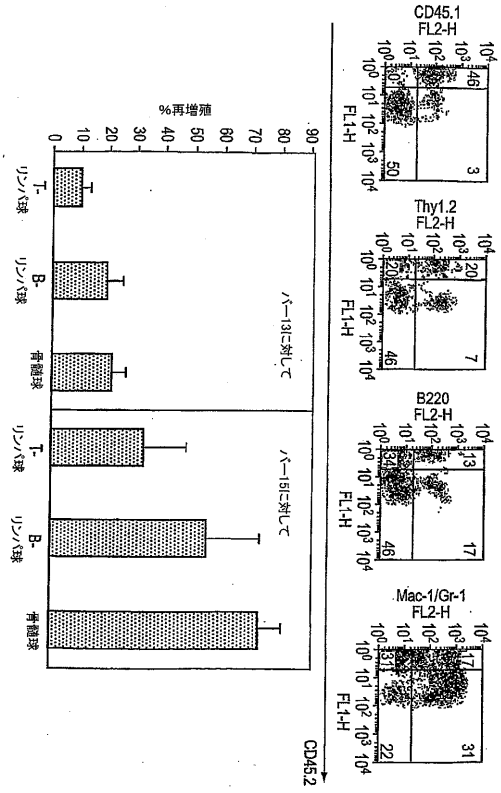
【図２】


S/F
S/F+Angptl2
SCF
S+A
S+T
S+T+A
S+T+I+F
S+T+I+F+A

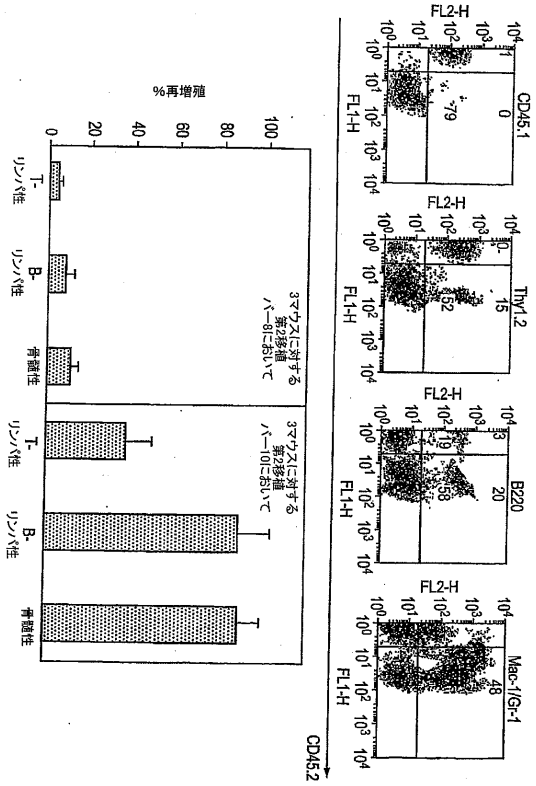
【図３Ａ】


%再増殖
0
10
20
30
40
50
60
70
0日間
5日間 SCF
5日間 SCF+Angptl2
10日間 S+T+I+F
10日間 S+T+I+F+A
3週間
4ヶ月
9ヶ月
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

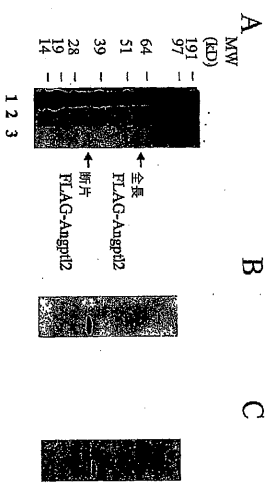
【図３Ｂ】


%再増殖
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
T-リンパ球
B-リンパ球
骨髄球
T-リンパ球
B-リンパ球
骨髄球
バー13に対して
バー15に対して
CD45.2
CD45.1
FL2-H
Thy1.2
FL2-H
B220
FL2-H
Mac-1/Gr-1
FL2-H
FL1-H
46
3
50
20
7
46
13
17
46
17
31
22

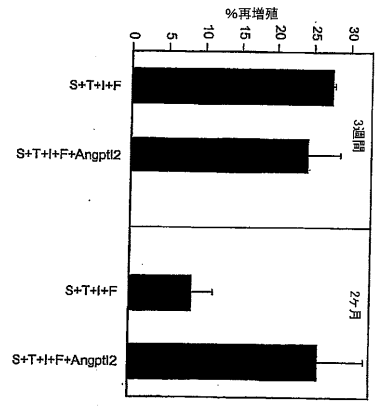
【図３Ｃ】


%再増殖
T-リンパ性
B-リンパ性
骨髄性
3マウスに対する第2移植パーセントにおいて
3マウスに対する第2移植パーセントにおいて
CD45.1
Thy1.2
B220
Mac-1/Gr-1
FL2-H
FL1-H
CD45.2

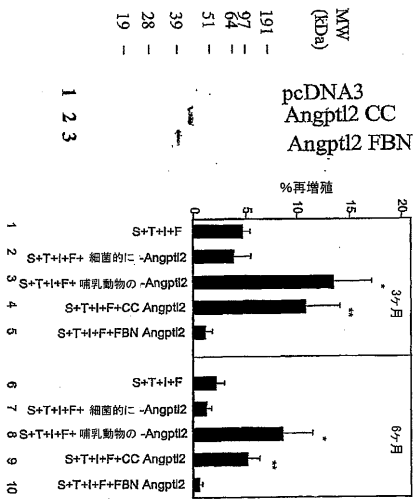
【図４】


A
MW (kD)
191
97
64
51
39
28
19
14
1 2 3
断片 FLAG-Angptl2
全長 FLAG-Angptl2
B
C

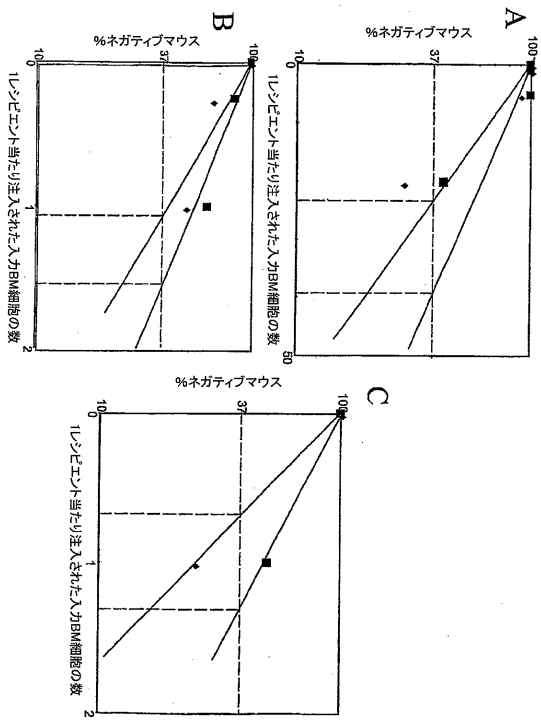
【図５】


%再増殖
S+T+I+F
S+T+I+F+Angptl2
S+T+I+F
S+T+I+F+Angptl2
3週間
2ヶ月

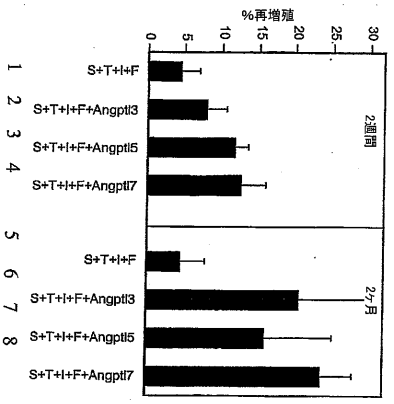
【図６】


MW (kDa)
191
97
64
51
39
28
19
1 2 3
pcDNA3
Angptl2 CC
Angptl2 FBN
%再増殖
S+T+I+F
S+T+I+F+ 細菌的に -Angptl2
S+T+I+F+ 哺乳動物の -Angptl2
S+T+I+F+CC Angptl2
S+T+I+F+FBN Angptl2
3ヶ月
6ヶ月

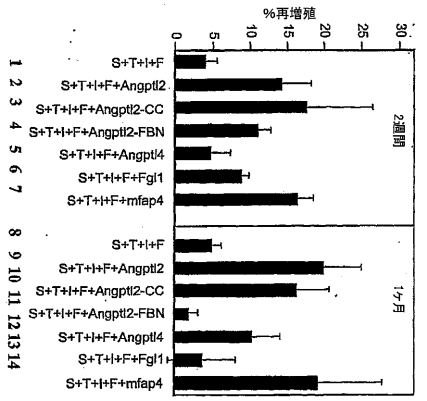
【図７】



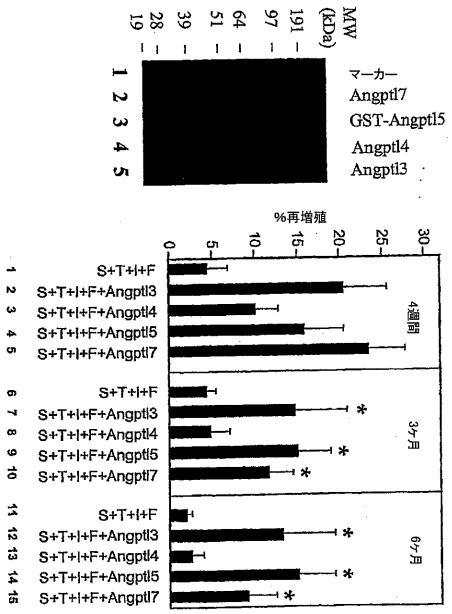
【図８】



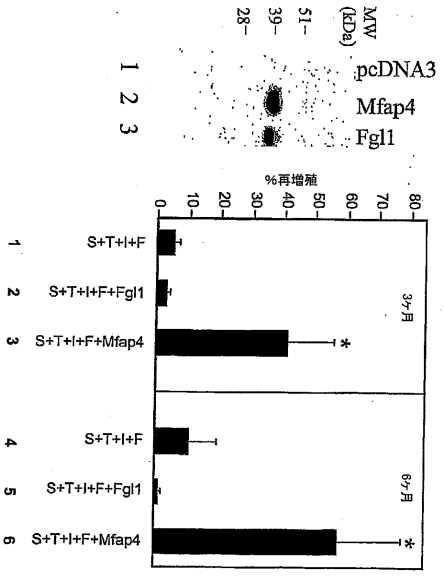
【図９】



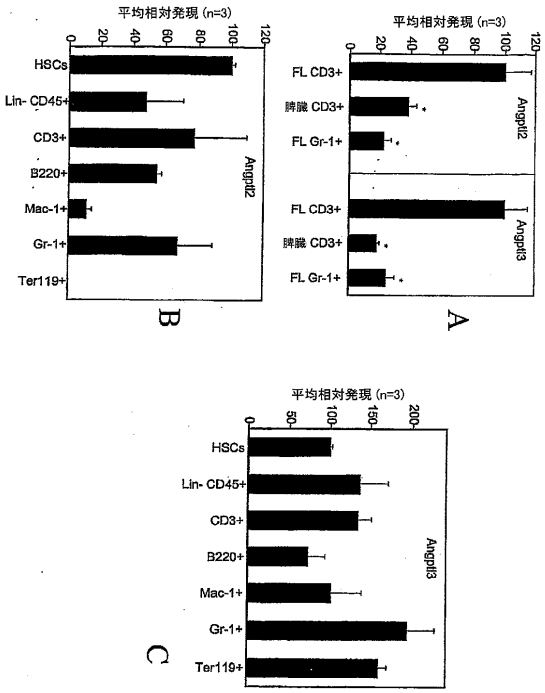
【図１０Ａ】



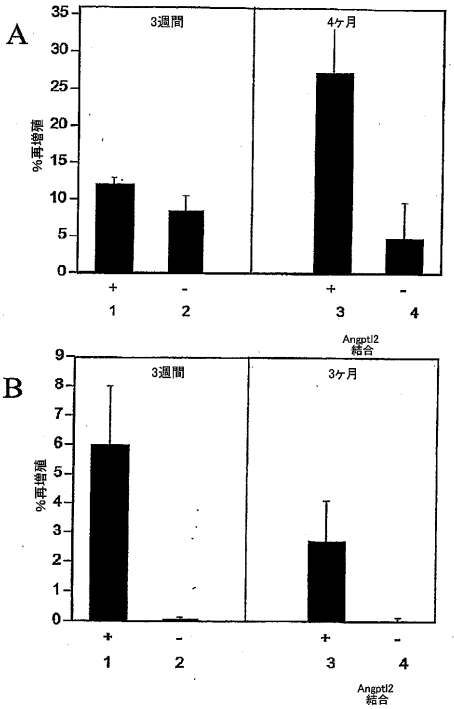
【図１０Ｂ】



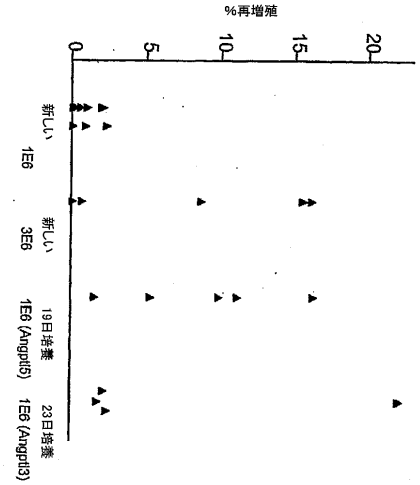
【図１１】



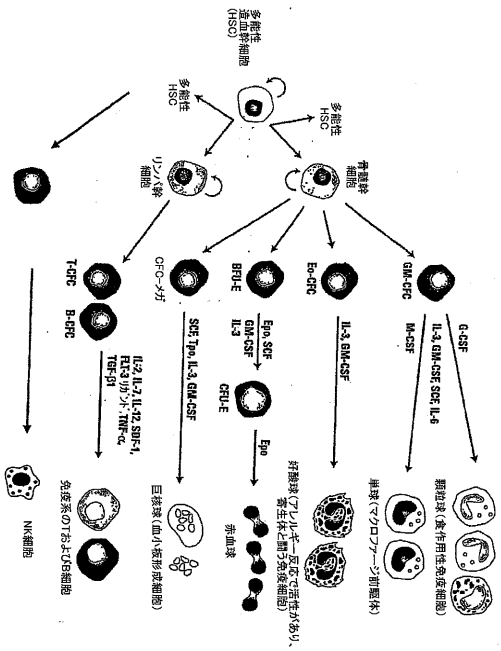
【図１２】



【図１３】



【図１４】



【図１５】

配列番号3

```
   1 mrplcvtcww lgllaamgav agqedgfegt eegsprefiy lnrykrages qdkctytfiv
  61 pqqrvtgaic vnskepevll enrvhkqele llnnellkqk rqietlqqlv evdggivsev
 121 kllrkesrnm nszvtqlymq llheiirkrd nalelsqlen rilnqtadml qlaskykdle
 181 hkyqhlatla hnqseiiaql eehcqrvpsa rpvpqpppaa pprvyqppty nriinqistn
 241 eiqsdqnlkv lppplptmpt ltslpsstdk psgpwrdclq aledghdtss iylvkpentn
 301 rlmqvwcdqr hdpggwtviq rrldgsvnff rnwetykqgf gnidgeywlg leniywltnq
 361 gnykllvtme dwsgrkvfae yasfrlepes eyyklrlgry hgnagdsftw hngkqfttld
 421 rdhdvytgnc ahyqkggwwy nacahsnlng vwyrgghyrs ryqdgvywae frggsyslkk
 481 vvmmirpnpn tfh
```

配列番号4

```
   1 mftiklllfi vplvissrid qdnssfdsls pepksrfaml ddvkilangl lqlghglkdf
  61 vhktkgqind ifqklnifdq sfydlslqts eikeeekelr rttyklqvkn eevknmslel
 121 nsklesllee killqqkvky leeqltnliq nqpetpehpe vtslktfvek qdnsikdllq
 181 tvedqykqln qqhsqikeie nqlrrtsiqe pteislsskp raprttpflq lneirnvkhd
 241 gipaecttiy nrgehtsgmy airpsnsqvf hvycdvisgs pwtliqhrid gsqnfnetwe
 301 nykygfgrld gefwlgleki ysivkqanyv lrieledwkd nkhyieysfy lgnhetnytl
 361 hlvaitgnvp naipenkdlv fstwdhkakg hfncpegysg gwwwhdecge nnlngkynkp
 421 rakskperrr glswksqngr lysikstkml ihptdsesfe
```

配列番号5

```
   1 msgaptagaa lmlcaatavl lsaqggpvqs ksprfaswde mnvlahgllq lgqglrehae
  61 rtrsqlsale rrlsacgsac qgtegstdlp lapesrvdpe vlhslqtqlk aqnsriqqlf
 121 hkvaqqqrhl ekqhlriqhl qsqfglldhk hldhevakpa rrkrlpemaq pvdpahnvsr
 181 lhrlprdcqe lfqvgerqsg lfeiqpqgsp pflvnckmts dggwtviqrr hdgsvdfnrp
 241 weaykagfgd phgefwlgle kvhsitgdrn srlavqlrdw dgnaellqfs vhlggedtay
 301 slqltapvag qlgattvpps glsvpfstwd qdhdlrrdkn cakslsggww fgtcshsnln
 361 gqyfrsipqq rqklkkgifw ktwrgryypl qattmliqpm aaeaas
```

配列番号6

```
   1 mmspsqasll flnvcificg eavqgncvhh stdssvvniv edgsnakdes ksndtvcked
  61 ceescdvktk itreekhfmc rnlqnsivsy trstkkllrn mmdeqqasld ylsnqvnelm
 121 nrvllttev frkqldpfph rpvqshgldc tdikdtigsv tktpsglyii hpegssypfe
 181 vncdmdyrgg gwtviqkrid giidfqrlwc dyldgfgdll gefwlglkki fyivnqknts
 241 fmlyvalese ddtlayasyd nfwledetrf fkmhlgrysg nagdafrglk kednqnamgf
 301 stsdvdndgc rpaclvngqs vkscshlhnk tgwwfnecgl anlngihhfs gkllatgiqw
 361 gtwtknnspv kiksvsmkir rmynpyfk
```

【配列表】

2008545412000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/020078

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/06 A61K35/14 G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	EP 1 308 511 A (MERMAID PHARMACEUTICALS GMBH [DE]) 7 May 2003 (2003-05-07) the whole document	1,2,18, 19,39 3-17, 20-38, 40-46
X Y	EP 0 962 530 A2 (LILLY CO ELI [US] LILLY CO ELI) 8 December 1999 (1999-12-08) the whole document	1,18,39 2-17, 19-38, 40-46
X Y	WO 00/52167 A1 (REGENERON PHARMA [US]; JONES PAMELA F [GB]; VALENZUELA DAVID M [US]) 8 September 2000 (2000-09-08) the whole document	1,18,39 2-17, 19-38, 40-46

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 November 2006	04/12/2006

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Morawetz, Renate

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/020078

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHANG CHENG CHENG ET AL: "Murine hematopoietic stem cells change their surface phenotype during ex vivo expansion" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPANY, ORLANDO, FL, US, vol. 105, no. 11, 8 February 2005 (2005-02-08), pages 4314-4320,4308, XP002382752 ISSN: 0006-4971	18
Y	the whole document	1-17, 19-46
X	ZHANG CHENG CHENG ET AL: "Insulin-like growth factor 2 expressed in a novel fetal liver cell population is a growth factor for hematopoietic stem cells" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPANY, ORLANDO, FL, US, vol. 103, no. 7, 30 October 2003 (2003-10-30), pages 2513-2521, XP002382851 ISSN: 0006-4971	18
Y	the whole document	1-17, 19-46
X	CHEN CHANG-ZHENG ET AL: "Identification of endoglin as a functional marker that defines long-term repopulating hematopoietic stem cells." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 99, no. 24, 26 November 2002 (2002-11-26), pages 15468-15473, XP002408121 ISSN: 0027-8424	18
Y	the whole document	1-17, 19-46
X	CHOONG M L ET AL: "A novel role for proliferin-2 in the ex vivo expansion of hematopoietic stem cells" FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 550, no. 1-3, 28 August 2003 (2003-08-28), pages 155-162, XP004448385 ISSN: 0014-5793	18
Y	the whole document	1-17, 19-46

-/—

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/020078

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CAMENISCH G ET AL: "ANGPTL3 stimulates endothelial cell adhesion and migration via integrin alphavbeta3 and induces blood vessel formation in vivo" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,, US, vol. 277, no. 19, 10 May 2002 (2002-05-10), pages 17281-17290, XP002333996 ISSN: 0021-9258	37-41, 45,46
Y	the whole document	1-36, 42-44
X	KIM ET AL: "Molecular cloning, expression, and characterization of angiopoietin-related protein. Angiopoietin-related protein induces endothelial cell sprouting" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,, US, 10 September 1999 (1999-09-10), pages 26523-26528, XP002146664 ISSN: 0021-9258	39,41, 44-46
Y	the whole document	1-38,40, 42,43
Y	OIKE YUICHI ET AL: "Angiopoietin-related/angiopoietin-like proteins regulate angiogenesis" INTERNATIONAL JOURNAL OF HEMATOLOGY, vol. 80, no. 1, July 2004 (2004-07), pages 21-28, XP009075061 ISSN: 0925-5710 the whole document	1-46
P,X	ZHANG CHENG CHENG ET AL: "Angiopoietin-like proteins stimulate ex vivo expansion of hematopoietic stem cells" NATURE MEDICINE, vol. 12, no. 2, February 2006 (2006-02), pages 240-245, XP002408122 ISSN: 1078-8956 the whole document	1-46

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/020078

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 31-36 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2006/020078

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 1308511	A	07-05-2003	NONE		
EP 0962530	A2	08-12-1999	AU	4320499 A	20-12-1999
			WO	9962925 A1	09-12-1999
WO 0052167	A1	08-09-2000	AU	3359600 A	21-09-2000
			CA	2362547 A1	08-09-2000
			EP	1157111 A1	28-11-2001
			JP	2002537813 A	12-11-2002

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 35/48	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	35/48	
Ａ６１Ｐ 7/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	7/00	
Ａ６１Ｐ 37/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/04	
Ａ６１Ｐ 31/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/04	
Ａ６１Ｐ 7/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	7/04	
Ａ６１Ｐ 7/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	7/06	
Ａ６１Ｐ 31/18	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/18	
Ａ６１Ｌ 27/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｌ	27/00	Ｚ

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 チャン，チェンチェン
アメリカ合衆国 ０２４７４ マサチューセッツ州，アーリントン，グローブ ストリート ７１，ナンバー１２
(72)発明者 ロディッシュ，ハーベイ
アメリカ合衆国 ０２１４６ マサチューセッツ州，ブルックライン，フィッシュー アベニュー １９５

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA04 DA03 EA04 GA11 HA03
4B063 QA18 QQ08 QQ79 QR48 QR56 QR77 QS32 QS36 QX02
4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 BA25 BB19 BB32 BB34 CA44 CA46
4C081 AB11 BA12 BC01 CD34 DA15 EA01 EA11 EA12
4C087 AA01 CA04 MA21 MA66 NA14 ZA51 ZA55 ZB09 ZB33 ZB35 ZC55